

**UNIVERSIDAD DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Nuevo método de valoración de la vitamina D**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Luis Fontán Candela**

**Madrid, 2015**

NUEVO METODO DE VALORACION  
DE LA  
VITAMINA D

Universidad de Madrid. Facultad de Ciencias.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



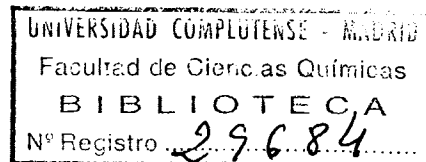
5314913158

T1  
577.565.2  
FON

NUEVO METODO DE VALORACION DE LA VITAMINA D

Memoria que presenta para aspirar al **Grado** de  
Doctor (Sección de Químicas) el Licenciado en  
Ciencias (Sección de Químicas y de Físico-quí-  
micas).

D. JOSE LUIS FONTAN CANDELA.



Madrid. Sección de Bioquímica del Instituto Español  
de Fisiología y Bioquímica. Años 1947, 48 y  
49.

b 56364806  
i 29929581

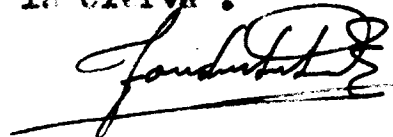
or

Respetable Tribunal:

Terminadas mis Licenciaturas en la Facultad de Ciencias de Madrid, y cursadas las asignaturas del Doctorado, inicié mis experiencias en el campo de la investigación en el Instituto Español de Fisiología y Bioquímica del C.S.I.C., en cuya Sección de Bioquímica realicé el presente trabajo (que versa sobre un nuevo método de valoración química de las vitaminas D), que tengo el honor de presentar como Tesis Doctoral en la Sección de Ciencias Químicas.

Es un grato deber para mí el expresar mi profundo reconocimiento a D. Angel Santos Ruiz por su dirección; asimismo al Dr. Villar Palasí por su colaboración.

Debo de consignar también que mis experiencias han podido ser llevadas a cabo gracias a la ayuda económica que percibí como becario del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica primeramente y después como becario del Patronato "Juan de la Cierva".



## I N D I C E

.....	
Al Tribunal . . . . .	III
Indice . . . . .	IV

## PARTE TEORICA

## Las vitaminas D

## 1. Generalidades

1. 1. Historia . . . . .	2
1. 2. Diversidad . . . . .	7
1. 3. Propiedades. . . . .v. . . . .	9
1. 4. Aislamiento. . . . .	15

## 2. Determinación

2. 1. Métodos biológicos . . . . .	19
2. 2. Métodos físicos . . . . .	21
2. 3. Métodos químicos . . . . .	22

v

3. Necesidad de un buen método de valoración . . . . .	29
--	----

#### PARTE EXPERIMENTAL

1. Estudio de una nueva reacción coloreada que permite evaluar cuantitativamente las vitaminas " " . .	
1. 1. Primeras experiencias. Ley de Beer. . . . .	33
1. 2. Necesidad de un reductor. . . . .	38
1. 3. Necesidad de un deshidratante y de un generador protónico . . . . .	42
1. 4. Influencia del disolvente . . . . .	44
1. 5. Ensayos térmicos	
a) Temperatura de formación . . . . .	45
b) Variación térmica. . . . .	46
1. 6. Influencia de la luz. . . . .	47
2. Reactivos y aparatos empleados	
2. 1. Naturaleza de los reactivos . . . . .	49
2. 2. Soluciones preparadas . . . . .	51

2. 3. Matraces, pipetas y soporte. . . . .	57
2. 4. Calofotómetro, cubetas y filtro. . . . .	53
2. 5. Soluciones hitos . . . . .	56
3. Técnica de la reacción . . . . .	59
4. Ensayos con vitamina $D_2$ aislada, y estudio de los errores que se pueden cometer en su análisis . . . . .	
4. 1. Obtención de la curva de calibrado . . . . .	61
4. 2. Variación del furfural . . . . .	65
4. 3. Variación del ácido sulfúrico. . . . .	65
4. 4. Variación del agua . . . . .	68
4. 5. Variación en el tiempo . . . . .	75
5. Aplicación de la reacción a la determinación cuantitati- va de la vitamina D en aceites.	
5. 1. Vitaminas $D_2$ y $D_3$ aisladas . . . . .	81
5. 2. Con vitamina A en aceites animales . . . . .	82

5. 3. Con $\beta$ caroteno en aceites vegetales. . . . .	88
6. Comportamiento de la reacción con sustancias esteroídicas análogas . . . . .	94

#### CONSIDERACIONES

1. Consideraciones sobre los resultados . . . . .	99
2. Intento de explicación teórica de los fenómenos observados .	119

#### CONCLUSIONES . . . . .

Figuras . . . . .	134
Bibliografía. . . . .	153



**P A R T E      T E O R I C A**

## **LAS VITAMINAS D**

### **1. Generalidades.**

1. 1. HISTORIA. La enfermedad denominada raquitismo, fué descrita por primera vez en 1610 por el médico inglés Glisson (3 22); pero la enfermedad, como es lógico, debe de haber existido desde la aparición de la vida sobre la tierra, como nos lo dicen, bien claramente, los huesos de animales hallados en terrenos de las primeras edades. En 1832, Trousseau (T 8) recomienda el empleo del aceite de hígado de bacalao en la cura del raquitismo, y en la misma época Sniadecki (M 11) habla también de otra suerte de curaciones, las efectuadas por medio de los rayos solares. Hopkins sugiere en 1906 (M 17) (M 18), que la causa del raquitismo es la ausencia, en la dieta, de ciertos alimentos -medicinas- necesarios; y en 1913 Maczynski estudia el beneficioso influjo ejercido por la luz solar sobre la asimilación del calcio en los perros. (M 1)

Mellanby trabajando con cachorros, en 1919 (M 4 y 5), observa que alimentándolos especialmente, se les genera raquitismo, y que, añadiendo a su dieta grasas animales, les desaparece la enfermedad; por tanto afirma que existe un "factor antirraquítico", y que éste, o es la vitamina A, o es otra substancia que coexiste con ella. En el mismo año prueba Muldschinsky (M 19 y 20) que el raquitismo puede curarse por la acción de la luz ultravioleta.

En 1922 Zucker y otros (Z 1) descubren que el factor antirraquítico se encuentra en la fracción insaponificable de los aceites de hígado de peces. Mc. Collum y sus colaboradores (C 5 y 6) aseguran que el factor antirraquítico no es la vitamina A, puesto que aquel, a diferencia de ésta, no se destruye cuando es atravesado por burbujas de aire caliente. Al mismo tiempo, otros investigadores (M 21 y S 13) trabajando aisladamente determinan también la diversidad existente entre la vitamina A y el factor antirraquítico, al comprobar que la luz no podía curar los efectos causados por la falta de vitamina A.

Hess y Gutman (H 11) expresan la opinión de que el efecto curativo que producían los aceites de hígado de peces, se debía a la misma causa que el producido por la luz. En el mismo año Hess, Weinstock y Steenbock (H 12 a 14 y S 18 a 20) descubren que ciertos alimentos sometidos a la acción de la luz ultravioleta adquieren propiedades antirraquíticas, y deducen, por tanto, que existe en la piel una sustancia idéntica a la de los alimentos, que es la que se activa, y la denominan "provitamina D". Los investigadores inmediatamente citados (H 15 y S 20 y 21) y Rosenheim y Webster (R 21) en 1925, descubren que la fracción esterínica de los alimentos, (aunque por sí misma no tenía acción antirraquítica), era la que recogía las radiaciones ultravioleta, y la que se transformaba en sustancia antirraquítica.

En 1925-26 diversos grupos de investigadores (H 7 y 8, P 6, R 9 a 11 y S 19) llegan a la conclusión de que ciertas impurezas presentes en la colestestina y citosterina eran las causantes de la acción an-

tirraquítica, después de ser irradiadas. Las experiencias de Windaus y Hess (W 5 a 7), Pohl (P 6), y Rosenheim y Webster (R 11 a 13) mostraron física, química y biológicamente, que la impureza mencionada, que actuaba de provitamina, era la ergosterina u otra esterina de constitución análoga (la ergosterina, aunque fué descubierta por Braconnot en 1811, fué llamada así por Tanret (T 1 a 5), y debe su nombre a haberla extraído éste del cornucuelo de centeno -ergot de siegle, en francés- hongo parásito del centeno, de donde se obtiene también la ergotina). Entre 1929 y 31 Reerink y van Sijk (R 2 y 3) y otros (A4 y W 8 y 10) lograron cristalizar el producto resultante de la irradiación de la ergosterina, que se llamó vitamina D<sub>1</sub>; pero era aún una vitamina impura.

Varios investigadores (M 2 y 14) encontraron en 1930 que, la vitamina D obtenida de la ergosterina irradiada, no era tan activa como la extraída del aceite de hígado de bacalao.

En 1931 y 32 Windaus y Linsert (W 11) y Askerow y colaboradores

(A 3) consiguen al fin, cristalizar vitamina D pura.

Windaus y Langer preparan en 1933 (W 13) por procedimiento sintético una nueva provitamina D, la 22 dihidroergosterina.

En 1934 Waddell encuentra una vitamina D activando crudos de colesterol (W 1) de lo que deduce que la provitamina presente en el colesterol tiene que ser diferente de la ergosterina. En 1935 Windaus, Lettré y Schenck (W 14) sintetizan aquella hipotética provitamina D a partir de la colesisterina, es la 7 dehidrocolesisterina; y en 1936 (B 5) y en 1937 (W 16) es aislada partiendo de la colesisterina.

Brockmann (B 6, 8 y 9) y otros investigadores (H 4 y S 15) en 1936 consiguen cristalizar, en forma de ester, la vitamina D procedente del aceite de hígado de halibut, y establecen que esta vitamina debe ser el producto resultante de la irradiación de la 7 dehidrocolesisterina, y Schenck, activando esta substancia, llega a preparar en 1937 (S 7) la vitamina D<sub>3</sub> cristalizada.

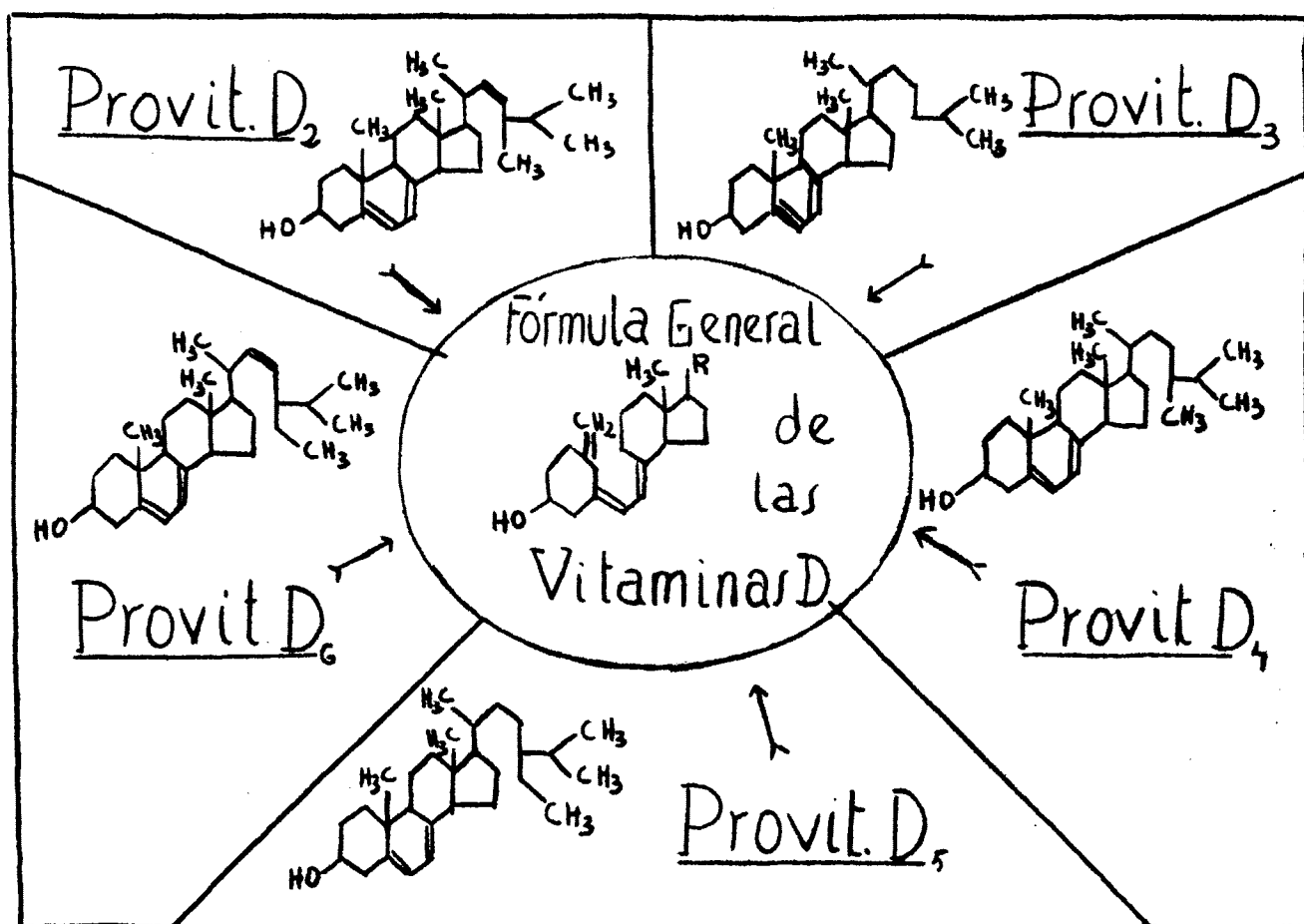
En 1938 (B 2) se aísla una nueva vitamina D, de menor actividad

biológica que las anteriores, por destilación molecular del aceite de hígado de bacalao.

Esta sinopsis de la historia de las vitaminas D nos muestra, al par que el proceso natural de cualquier investigación científica, las analogías entre las distintas vitaminas D descubiertas y posibles; y además, sus constituciones; y por tanto, sus propiedades.

1. 2. DIVERSIDAD. Vitamina D sin subíndice, expresa hoy día lo mismo que vitaminas D, puesto que no se refiere a ninguna fórmula concreta, sino a cualquier sustancia que posea la propiedad de vitamina D.

Vitamina  $D_1$  es el nombre con que se denominó lo que se aisló primeramente, posterior a esto se comprobó que no era una especie química, sino un compuesto molecular constituido por vitamina  $D_2$  y lumisterina, y por tanto, al obtenerse la vitamina  $D_2$  pura, dejó la  $D_1$  de existir.





Vitamina  $D_2$  (W. 12), llamada calciferol por los ingleses, y viosterol por los norteamericanos, es entre los productos de irradiación de la ergosterina (B 3 y W 2) el único que cuenta con propiedades antirraquíticas.

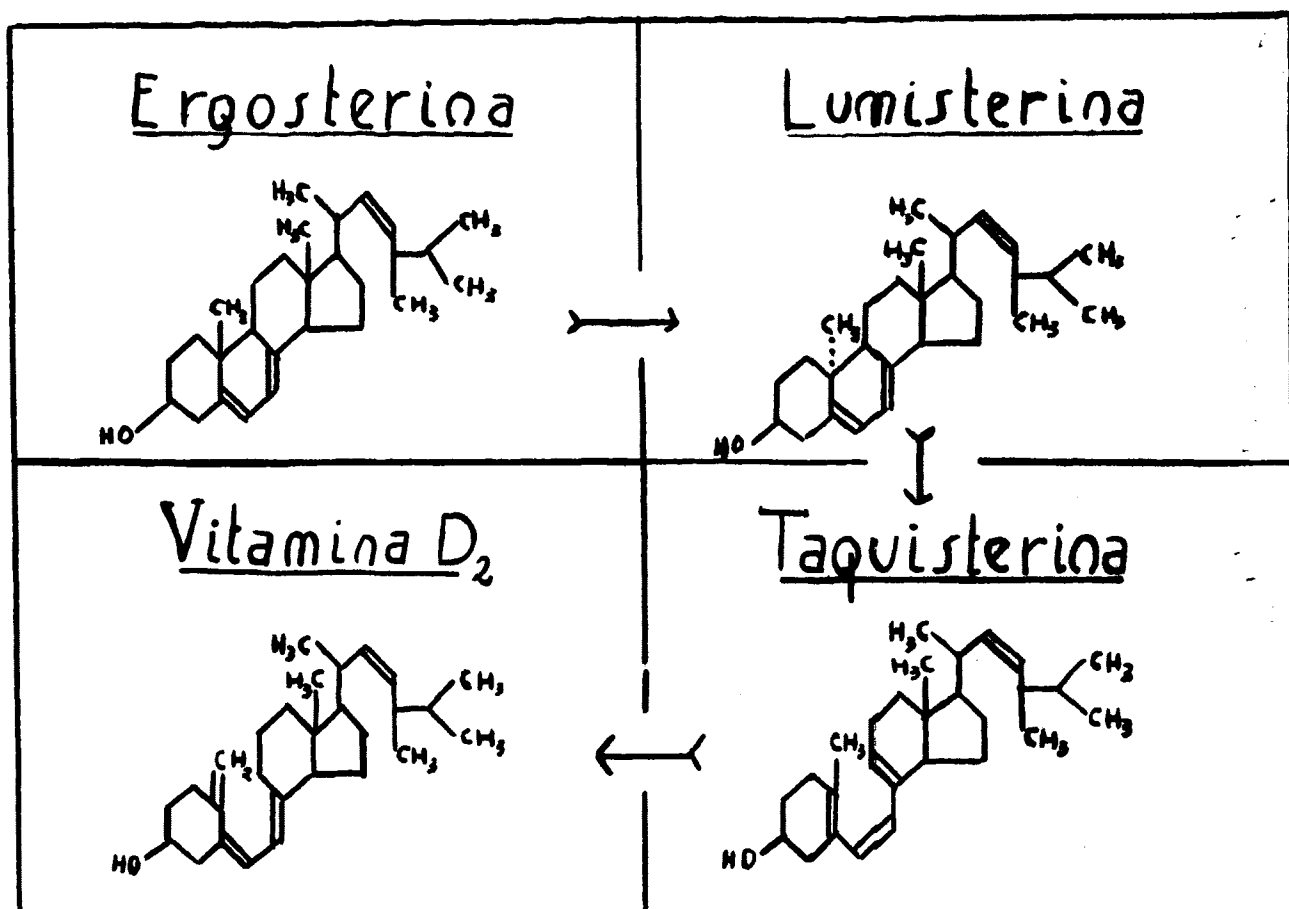
Vitamina  $M_3$  (W. 16) se obtiene como producto de irradiación de la 7 dehidrocolesterina, y principalmente de los aceites de hígado de animales marinos. Es la vitamina que <sup>se</sup> genera en los mamíferos por la acción solar. Su acción antirraquítica es semejante a la producida por la vitamina  $D_2$ .

Vitamina  $D_4$  (W 13 y 17) es la que se obtiene al irradiar la 22 dihidroergosterina (I 1).

Vitamina  $M_5$  (W 27) se produce al irradiar la 7 dehidrositosterina.

Vitamina  $D_3$  (L 3) se ha obtenido irradiando la 7 dehidroestigmasterina.

**L. 3. PROPIEDADES.** Las propiedades comunes a todas las vitaminas

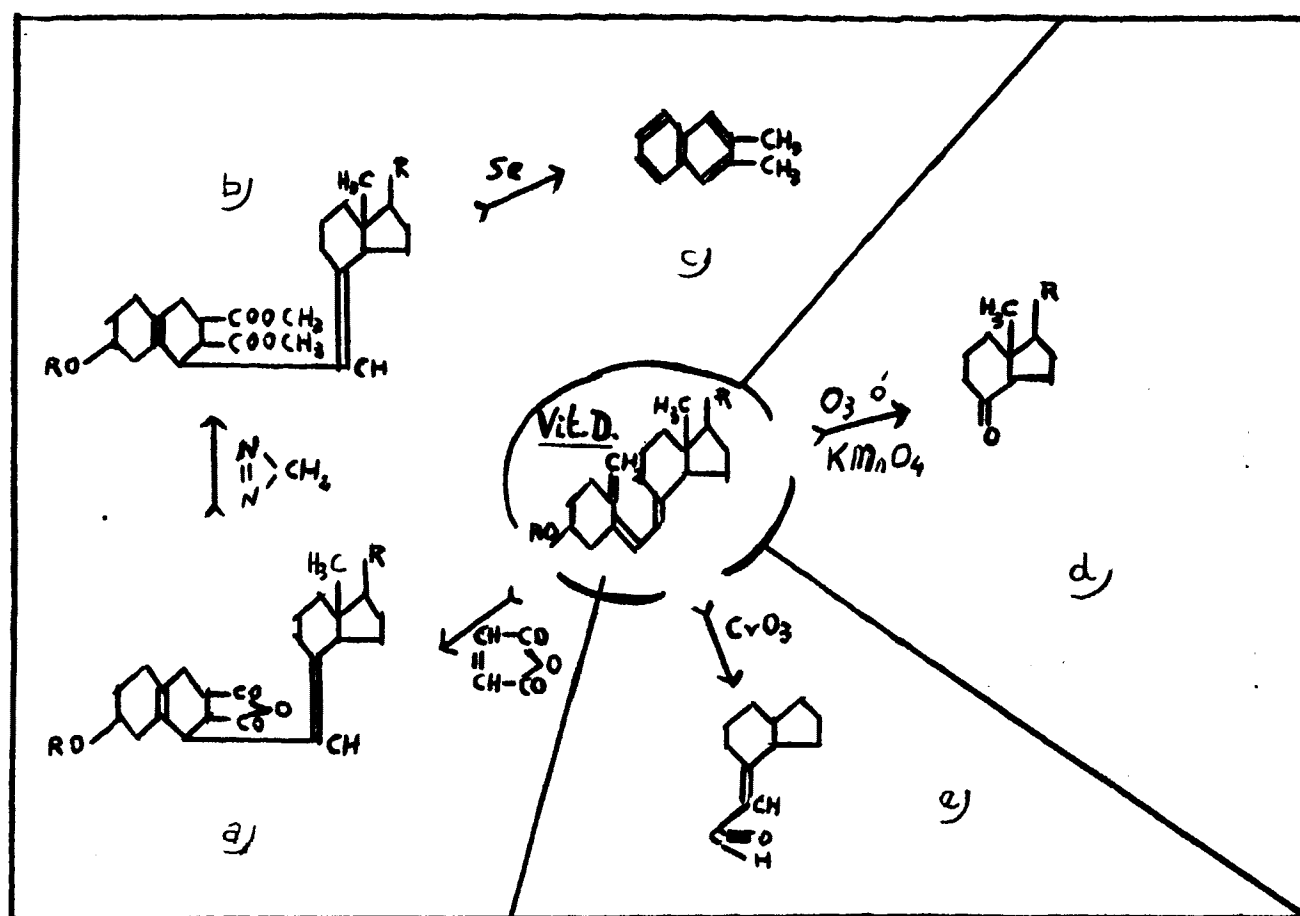


Actividad biológica de las sustancias antirraquíticas conocidas

Provitaminas D	Vitaminas D	U.I. $\times 10^6$ en mgr.
Ergosterina	D <sub>2</sub>	40
Epiergosterina	"	desconocida
7 dehidrocolesterina	D <sub>3</sub>	40
Epí 7 dehidrocolesterina	"	4
22 dehidroergosterina	D <sub>4</sub>	20-50
7 dehidrositosterina	D <sub>5</sub>	1,5
7 dehidroestigmasterina	D <sub>6</sub>	0,1
22-23 oxiergosterina	---	débilmente activa
Provitamina D de la almeja	---	40
5,7 androstandienodiol 3,17	---	0,1
Acido 3hidroxí5,7ecoladiénico	---	0,1
7 dehidrocomposterina	---	0,72
-----	dihidro - taquisterina	0,2

D, son: (B 2) blancas, inodoras, cristalizan bien, al contrario de la ergosterina, no precipitan con digitonina; son solubles en las grasas y en los disolventes de las grasas, y en general, en todos los disolventes orgánicos corrientes, como eter, cloroformo, acetona, alcohol. Son insolubles en el agua. Sus espectros de absorción muestran una curva continua con un máximo en  $265 \text{ m}\mu$  (en exano o eter); por tanto, el que se observen bandas en él, es una clara señal de impurezas. Debido a su oxhidrilo alcohólico, producen ésteres con los ácidos, los cuales saponificados regeneran la vitamina con toda su potencia biológica. En ausencia de oxígeno y de la luz, y a temperaturas no superiores a la normal, lo mismo aisladas que disueltas en aceites, se conservan inalteradas durante muchos meses. Son termolábiles, y aunque resisten bien la temperatura de  $100^{\circ} \text{C}$ , sin alterarse durante mucho tiempo, a mayores temperaturas pierden rápidamente su actividad fisiológica. (En la D<sub>2</sub>, por ejemplo, a  $180^{\circ} \text{C}$ . (W 9) genera una mezcla equimolecular de pirocalciferol (B 12) e isocalci-

ferol (A 5) los cuales han regenerado la unión de los carbonos 3 y 9). Son estables a los álcalis, pero los ácidos minerales las destruyen, así como el formaldehído, el agua oxigenada y los gases nitrosos. Los dobles enlaces son comprobables por hidrogenación catalítica. Las dehidrogenaciones con selenio no producen núcleos ciclopenteno-fenántrénicos, como les sucede a las provitaminas, por no existir en ellas ese núcleo. Se demuestra la existencia del nuevo doble enlace en 10 - 18 por la adición del anhídrido maléico, estando la vitamina esterificada, (W 15) que produce (a), el cual tratado con diazometano, da (b), y éste último dehidrogenado con selenio, produce un derivado naftalénico(c). Al mismo tiempo, la anterior condensación de Diels ratifica, que sigue existiendo en las vitaminas el doble enlace 5-6 (en conjugación con el 10-18). Las reacciones con ácido crómico que produce (d), con  $\text{KMnO}_4$  que origina (e) y con ozono que da (e), demuestran ampliamente la rotura del enlace 9-10 existente en las provitaminas entre los núcleos B y C (D 4). (En las vitaminas



sin doble enlace en la cadena lateral, son idénticos los productos resultantes de la reacción del  $\text{KMnO}_4$  y del  $\text{O}_3$ ; en los que existe el  $\text{O}_3$  los rompe, generando un cetoácido).

1. 4. AISLAMIENTO/ La vitamina D debido a sus propiedades, siempre se encuentra en las grasas. Según Vogel (V 4) si se extrae sin saponificar, no se separa por completo toda la vitamina D existente, y además, queda acompañada de esterinas, fosfátidos, y grasas neutras; por tanto se debe saponificar.

La separación de esterinas puede efectuarse por dos procedimientos:

a) El de Suerrant (8 24) fundado en la pequeña solubilidad de las esterinas en alcohol metílico en frío. Se disuelve el insaponificable en alcohol metílico caliente, y se enfría a continuación a  $-10^\circ \text{C}$ ., separándose así la mayor parte de las esterinas, a continuación se evapora a 1/3 la solución, y se la lleva a  $-70^\circ \text{C}$ . con nieve carbónica para que se separen las esterinas restantes. Se re-

pite esta operación las veces necesarias hasta que no se observe formación de precipitado, y

b) Varios autores (B 6 y 8 y 9. H 4. N 3 y S 15) citan el hecho de que la digitonina ( $C_{56}H_{92}O_{29}$ ), al unirse con los esteroides que poseen un oxhidrilo en el carbono 3 y en la configuración  $\beta$  (como les sucede a todas las esterinas vegetales), forma el digitónido, (compuesto molecular constituido por cantidades equimoleculares de ambos constituyentes, y tan insoluble en alcohol, que basta un pequeño exceso de digitonina para efectuar una precipitación prácticamente cuantitativa). Conociendo la cantidad de esterinas presentes en el aceite, se puede realizar satisfactoriamente su precipitación por este procedimiento con una sola operación.

Siguiendo los métodos indicados, aún queda la vitamina D unida a la vitamina A. Los métodos conocidos para efectuar la separación, se fundan en:

1°. Agitación en mezcla de dos sustancias no solubles entre sí.



2°. Adsorciones cromatográficas.

3°. Adiciones con anhídridos de ácidos dicarboxílicos.

4°. Destilaciones moleculares an alto vacío.

Citas bibliográficas del primer método se encuentran en Meracher (N 3) y Brockmann (B 6, 8 y 9) los cuales utilizan pentano o benceno y metanol acuoso; las de Vogel (V 4) con eter de petróleo y ácido acético, o alcohol de 96 %; o bien, con alcohol metílico y otros hidrocarburos. Ejemplos del segundo método refieren Karrer (K 3 a 5) y Müller (M 12) con alúmina y Amerie y v. Rokeken con tierra montana. Para poner de manifiesto cómo estos métodos son mas preparativos que analíticos, se explica detalladamente un ejemplo que comprende conjuntamente el primero y segundo método. Brockmann (B 6) realiza dos tratamientos sucesivos con bencina y metanol, a los que siguen tres adsorciones cromatográficas con  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , eliminación del colorante usado para hacer visibles las capas cromatográficas, esterificación con cloruro de 3,5 dinitrobenceno, disolución en benceno-

-bencina, y vuelta a tratarlo con  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Aunque Rosenberg (R 6) manifiesta que son los mejores, sin embargo Ritsert (R 5) explica claramente, como era natural, que estos métodos que no aíslan bien la vitamina D, no pueden ser analíticamente perfectos. Ejemplos del tercer método son: el de Dalmer (D 1) con anhídrido maléico, el de Windaus (W 1b) con anhídrido citracónico, y el de Simons y Zuckers (S 15) y Ender (E 3 y 4) con anhídrido ftálico; y del cuarto método el de Haslewood y Drummond (H 4) y el de Hickman (H 16), Heilbron (H 10), Carr (C 2), Drummond (D 6) y Hume (H 22). Estos últimos métodos tampoco son cuantitativos. Dalmer también reconoce que con el suyo se obtiene solamente un 90 % de pureza. Se debe observar que, operando con este último método, fué como se descubrió la vitamina  $\text{D}_6$ .

## **2 Determinación.**

Los métodos empleados para la determinación de la vitamina D, se clasifican en tres grupos: biológicos, físicos y químicos.

2. 1. **MÉTODOS BIOLÓGICOS.**- Se basan en la producción de raquitismo en los animales en que se experimenta, y a continuación se va suministrando, a algunos de ellos, diferentes cantidades de vitamina D hasta su curación. Se emplean ratas o pollos, y se precisa un lote mínimo de 100 animales para que el error no rebase de un 4 %. Los métodos que describe la bibliografía son:

a) **Análisis del calcio y fósforo de los huesos.** Propuesto por Sherman y Steibeling (8 14); se funda en la menor proporción de calcio y fósforo que existe en huesos desengrasados de animales raquíticos, en comparación con la de los animales sanos. Se realiza en fémures.

b) **Aumento de peso.** Desarrollado por Coward (6 8). Se basa en la

relación observada en animales jóvenes, entre su peso y la cantidad de vitamina D que se les proporciona.

c) Histológico. Ideado por Mc Collum y colaboradores (C 7). Consiste en la observación de la línea que surge en las zonas de calcificación que está constituida por  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Se realiza con tibias, cúbitos o radios, a los cuales se hace una sección antes de sumergirlos en  $\text{AgNO}_3$ , para que el  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  se transforme en  $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ . Se lavan con agua destilada, y se les expone a una fuerte luz, hasta que las áreas calcificadas formen una mancha negra; se observa visual o fotográficamente la metafisis, para apreciar la línea de calcificación.

d)  $\text{P}_\text{H}$  de las heces. Sephcott y Bacharach (S 11) observaron que el  $\text{P}_\text{H}$  de las heces es alcalino en el raquitismo y que la curva de variación hacia la acidez, va paralela a la curación.

e) Radiográfico. Foulson y Lovenskiold (P 7) estudian con él las dependencias del raquitismo con la decalcificación, o sea, la irre-

gularidad de la zona de osificación, el espesor de la zona no calcificada diáfiso-epifisaria, y cuando ha lugar, la incurvación de la diáfisis de la tibia.

f) Relación cenizas/materia orgánica de los huesos. Chick y otros (C 3) observaron que la relación cenizas/materia orgánica fluctuaba de 0,4 a 0,8 en las ratas raquíticas y que es 1,5 en la rata normal.

2. 2. METODOS FISICOS.- Sólo existe uno de Beerink y Wijk (M 8, R 4 y T 6) que consiste en la medición de la intensidad del espectro de absorción en el ultravioleta, en el cual, las vitaminas D presentan un máximo en las 265m  $\mu$ . Este método sólo es valedero cuando la vitamina D se encuentra en ausencia de otros compuestos de análogo espectro de absorción; por tanto, no se puede utilizar en grupos de irradiación de la ergosterina, ni en aceites de pescado. En este último caso ha recomendado Marcussen (M 1) la saponificación y separación de esterinas (S 16) y de vitamina A por adsorción selectiva con  $Al_2O_3$ . Fuchs (F 1 y M 7) ha efectuado también determi-

Laclones en aceites de oliva y sésamo, así como *Manau* (P 2) en otros aceites.

## 2. 3. MÉTODOS QUÍMICOS.-

a) Reacción de Brockmann y Uhen (B 7). La vitamina D mas  $SbCl_3$  en solución clorofórmica, produce una coloración anaranjado-amarillenta, con un máximo de absorción en las  $500m \mu$ . Es determinable, por tanto, colorimétrica o espectroscópicamente. Se han analizado mediante ella, sustancias naturales que contenían pocas  $\gamma$  de vitamina D (L 2, R 8 y W 28). Una modificación de este método se efectúa agregando cloruro de acetilo (N 4). Tanto para la determinación colorimétrica, como para la espectroscópica, se recomienda la separación de vitamina A con tierra montana, y de esterinas con igitonina, por dar estas sustancias, en análogas condiciones, coloraciones y espectros idénticos. Milas y sus colaboradores (M 7) han tratado también de mejorarlo.

b) Reacción de Cruz-Coke (C 9). Una solución alcohólica de vita-

mina D, calentada a 80° C. con ácido clorhídrico concentrado, produce una coloración verde colorimetreable. Un pequeño exceso de  $\text{MCl}$ , o una disminución de la temperatura, produce un precipitado blanco. Con esta reacción se pueden determinar aproximadamente unas 500  $\gamma$  de vitamina D.

c) Reacción de Malden y Tzoni (H 1 y 2 y T 9). Una mezcla de vitamina D mas pirogalol en solución clorofórmica, (o de eter de petróleo o bencénica) se concentra en baño de maría. Se le añade una solución recién preparada de  $\text{AlCl}_3$  en alcohol absoluto, y siguiendo en el baño de agua, a los cuatro minutos origina una coloración violeta obscura que se puede determinar colorimétricamente, o con el fotómetro de Pulfrich. Se necesita vitamina pura, pues la taquisterina y suprasterina también producen dicha coloración. No se puede realizar en aceites.

d) Reacción de Kägi-Miescher (K 1 y V 3). Se disuelve vitamina D en acético glacial, se hierve con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, se le añade una

solución de  $\text{Br}_2$  en acético glacial, y aparece una coloración roja que pasa a verde. Un exceso de  $\text{Br}_2$  destruye la coloración. El  $\text{Br}_2$  puede substituirse por  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{I}_2$ , anhídridos de ácidos orgánicos, y aldehidos. El  $\text{H}_2\text{SO}_4$  puede substituirse por otros ácidos minerales. Las coloraciones que se producen en estas variantes son, principalmente, violetas, verdes y azules. Kagi describió esta reacción para esterinas. Kek y Thomas (K 1) la aplicaron sobre hormonas.

e) Reacción de Liebermann (L 2). Vitamina D en contacto con  $\text{HCOCl}_3$ , mas anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado, produce un anillo amarillo-rojo-violeta en la interfase, quedando verde el cloriformo. Esta es una antigua reacción de esterinas que Murchard (M 11) sistematizó. Heiduschka (H 6) estudió con ella la ergosterina. Wieland y Seibert (W4) manifiestan que la lumisterina, taquistestina, y suprasterina dan lugar a esta reacción de un modo mucho mas débil que la vitamina D.

f) Reacción de Meessenmaecker (M 3). Añadiendo una solución cloro-



fórmica de vitamina D (o ergosterina) a  $\text{ZnCl}_2$  y anhídrido acético, se observan coloraciones que viran del rosa al verde esmeralda. El  $\text{ZnCl}_2$  puede substituirse por  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

g) Reacción de Math (N 1 y 2). Vitamina D mas acetato mercurico en acético glacial y ácido sulfúrico, concentrado forman un anillo amarillo verdoso.

h) Reacción de Moller. (N 5). Vitamina D con cloruro estannoso en cloruro de tionilo genera una coloración rojo-anaranjada. Pincus (C 1) emplea  $\text{SbCl}_3$  en vez del  $\text{SnCl}_2$ .

i) Reacción de Pregl (P 8). Vitamina D con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado produce un color rojo intenso. El autor y Dane (D 2) estudiaron así los ácidos biliares, Dirscherl y Zilliken (D 5) hormonas y Woker y Antener (W 19 a 25) la vitamina D.

j) Reacción de Pettenkofer (P 4). Se llama así a la reacción que efectúan diversas substancias al mezclarlas con sacarosa en solución acuosa y ácido sulfúrico. La vitamina D, en estas condiciones, da lugar

a un anillo interfásico de varias tonalidades, que de arriba a abajo son: verde, violeta y rojiza. Se agrupan a continuación muchas experiencias posteriores que, aunque difieren de esta reacción, se pueden considerar variaciones suyas. Abe y Kawaguti (A 1 y 2) emplean vainillina y ácido fosfórico. Mammarsden (M 3) glucosa y ácido clorhídrico. Jenke (J 1) fosfórico y furfural. Kaziro y Shimara (K 6 y 7) benzaldehído y  $H_2SO_4$ . Ohyama (O 1) fructosa y HCl. Schaltigger (S 6) diversos aldehídos,  $H_2SO_4$  y trazas de  $HClO_4$ . Scherrer (S 8) benzaldehído y  $H_2SO_4$ . Schmidt (S 9) y Kerr (K 8) efectúanla en alcohol. Woker y Antener (W 20 a 25) con  $H_2SO_4$  y furfural, como antiguamente la realizó Udransky (U 1).

Es de destacar la experiencia de Villar Palasí (V 2) que, realizando la reacción en la forma primitiva, pero en medio alcohólico, consiguió un color azul homogéneo, y por tanto, colorimetreable.

**E) Reacción de Salkowsky (S 1 y M 6).** La vitamina D en solución clorofórmica con  $H_2SO_4$ , colorea de rojizo la capa sulfúrica.

l) Reacción de Shear (S 12). Vitamina D con una mezcla de anilina y clorhídrico, a la temperatura de ebullición, produce un color rojo. Esta reacción la consiguen también sustancias diversas, no activables, como la ergopinacona y el peróxido de ergosterina.

m) Reacción de Sobel.(S 17). Vitamina D con cloroformo mas la 1,3 diclorhidrina de la glicerina y cloruro de acetilo genera un color amarillo que pasa a verde azulado colorimetreable. Pirlot y Rouir (P 5) la consideran mejor que la de Brockmann, aunque no sigue la Ley de Beer. Trabajando sobre aceites (R 16) la valoran sin preocuparse de las sustancias que la acompañan y que desde luego interfieren la reacción.

n) Reacción de Stoeltzner (S 23). Vitamina D en solución aceitosa, mas  $PCl_5$  forma un color rojo pardo que va obscureciendo hasta quedar negro. Esta reacción la dan todas las vitaminas y hormonas (C 4).

o) Reacción de Tortelli y Jaffé (T 7). Estos dos italianos descubrieron esta reacción trabajando sobre grasas. Otros investigadores

(H 5 y 9, P 3 y W 3) ha aplicaron a la vitamina D. Vitamina D en solución aceitosa mas solución clorofórmica de  $\text{Br}_2$  origina un anillo azul en la interfase, a diferencia de la ergosterina que lo da verde. Santos Ruiz y Villar Palasí (S 3 y 4) Demostraron que el bromo efectúa la acción fundamental.

p) Reacción de Witt y Sullivan (W 18). Después de separar cromatográficamente la sustancias que acompañan a la vitamina D, utilizan  $\text{SbCl}_3$  en 1,2 dicloroetano y cloruro de acetilo.

### **# 3 Necesidad de un buen método de valoración.**

Los métodos de valoración de la vitamina D expuestos en el capítulo anterior, según Velazquez (V 1) no son perfectos. Los biológicos son mas perfectos, además incluyen la ventaja de necesitar menores cantidades de vitamina que los de los otros grupos. En cambio encierran grandes inconvenientes: larga ejecución, peligros de fracaso debido a muertes, infecciones etc., ser menos económicos; sin embargo para que consten de una gran exactitud, se necesita que los animales que sufren la experimentación, sean todos descendientes de una misma rama, y es imposible contar con tantos animales de la misma camada; además precisan que los antecesores hayan estado anteriormente sometidos a dietas apropiadas.

Los métodos físicos o espectroscópicos no son prácticos (P 5) por el hecho de que las sustancias que normalmente acompañan a las vita-

minas D, presenten máximos de absorción precisamente en las mismas longitudes de onda que ellas.

De los numerosos métodos químicos expuestos, la mayoría son simples reacciones cualitativas, y las que incluyen posibilidades colorimétricas, ofrecen las desventajas de no ser específicos, y de que las sustancias que se encuentran junto a la vitamina D produzcan coloraciones análogas, y como ya se ha visto en el capítulo 1 lo laborioso que resulta el aislamiento de la vitamina D cuando se trata de obtenerla, parece incongruente el repetir esas experiencias al analizar unas pocas gammas de dicha sustancia. Aparte de ello, los mas importantes el de Halden y Tzoni y el de Sobel, aunque permiten colorimetrías, no siguen la ley de Beer. Unicamente queda exceptuado de este repaso, el de Brockmann & Chen, pero ya se ha visto por las reformas en él introducidas, como debido a la inestabilidad del reactivo, y a las muchas precauciones que son necesarias para una buena reproductibilidad, es ya difícil su perfecta ejecución cuando se

encuentra aislada la vitamina; mas lo difícil se transforma en imposible cuando ella se encuentra unida a la vitamina A.

Se puede decir, por tanto, con toda justicia, que el problema de la valoración de la vitamina D no está resuelto todavía, y como aumenta cada vez mas la importancia de las vitaminas, debido a la multiplicidad de funciones catalíticas que realizan en los organismos, es cada vez mas ingente el volumen de su producción, y mas inminente por ende la resolución del problema de su valoración.

Pusímonos pues, a trabajar en ello, y después de repasar la multitud de reacciones que describe la bibliografía, se prestó atención preferente, al hecho recién descubierto por el Doctor Villar Palasi (V 2) de que la vitamina D<sub>2</sub>, expuesta a la reacción de Pettenkofer, modificada en el sentido de emplear medio alcohólico en vez de acuoso, y después de agitarla, producía una coloración azul celeste colorimetreable.

**P A R T E    E X P E R I M E N T A L**



**1. Estudio de una nueva reacción coloreada  
que permite evaluar cuantitativamente las vitaminas B.**

**1. 1. PRIMERAS EXPERIENCIAS. LEY DE BEER.-** Se comenzó este trabajo, repitiendo las experiencias descritas por V. Villar Palasí (V 2). " 1-2 mgs. de sacarosa, en unión de 1-2 mgs. de vitamina B<sub>2</sub>, se disuelven en 1-2 cc. de alcohol etílico. Se añaden unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Al agitar, se obtiene una coloración azul celeste estable".

Colocada la doble solución en un tubo de ensayo, se dejan caer sobre las paredes de éste, unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. El ácido, debido a su gran densidad, llega al fondo, formando una fase diferenciable de la alcohólica; A medida que es mayor el número de gotas ácidas introducidas, se va acentuando un color rojo claro en la capa ácida. En la interfase, se forma un anillo de mas

fuerse coloración, que se compone de varias tonalidades. Al agitar queda generalmente un único color, el cual, no concuerda siempre con el azul celeste previsto; algunas veces resulta violeta, verdoso o rojiza. En la parte inferior del anillo tira a rojo o castaño y en la superior violeta, verdoso o azulado; la fase situada encima de él siempre queda incolora.

Es curioso señalar que a esa coloración azul que muchos ensayos presentan en la interfase, cuando se la agita con una varilla (pero sólo a ella, junto con la fase superior), el color azul se difunde por la zona superior homogéneamente, pero no de modo estable, puesto que con el tiempo vuelve a caer a la interfase. Contrariamente, agitando conjuntamente todas las fases, sea azul el color resultante o sea otro cualquiera, permanece difundido de modo estable y homogéneo durante varios cientos de horas.

Se observa también que, cuando en el anillo interfásico se descubre el color azul, entre otros, éste color es el único que persiste

después de la agitación, y cuando aquel color no aparece en la interfase, tampoco lo hace posteriormente a la agitación.

Queriendo descubrir la causa de las distintas coloraciones que surgen en la reacción, se fueron modificando sistemáticamente las condiciones descritas por Villar Palasí, para poder fijar las bases de una buena repetibilidad. Así en una serie de ensayos en los cuales todo era idéntico menos la cantidad de sacarosa, la cual se iba incrementando gradualmente, se observa que, a medida que va aumentando la cantidad de dicho diholósido, van pasando los colores finales, después de la agitación, de azul celeste a azul grisáceo, violeta y lila.

En lo que respecta al ácido sulfúrico, se observó lo siguiente: Con pocas gotas de ácido ( 2 a 10), sólo se obtiene la coloración rojo rosácea en la fase ácida, pero no se forma ( o en tan pequeña masa que no es perceptible) anillo azulado y, al agitar, tampoco se ve dicho color, sino una dilución del rojo, con transformación a tonos rosáceos o amarillentos.

Cuando el ácido sulfúrico se introduce en la disolución con amplios intervalos entre la adición de una gota cualquiera y la siguiente, no es tan intensa la coloración del anillo interfásico, en comparación con la obtenida efectuando rápidamente el goteo, a mas de tardar de 15 a 30 segundos en producirse. Cuando no se forma el anillo, después de agitarlo, toma el todo una coloración de vino clarete. El mínimo necesario para producir la reacción son 16 a 20 gotas de ácido sulfúrico; pero cuando las cantidades de sulfúrico añadidas son mayores que las reseñadas, y el goteo se produce muy lentamente, llega un momento en que el único efecto visual observable, es un simple decremento del color rojo de la capa sulfúrica, o sea, una dilución de la reacción con su consiguiente decolorado. Si la reacción se verifica con una gran cantidad de sulfúrico introducido rápidamente, los colores que se obtienen al agitar son ocres.

Respecto a la función del alcohol se observa que, a medida que va siendo mayor su concentración acuosa, la reacción se va efectuando

con un grado menor de intensidad.

Si la mezcla del ácido con la solución etanólica se efectúa al revés de como se ha señalado hasta ahora, o sea, vertiendo la solución sobre el ácido, la reacción se produce igual e instantáneamente.

Esta coloración azul que se produce, esté o no expuesta la solución a la luz, con el tiempo se va oscureciendo, y así, un azul que recién obtenido sea pálido, a los dos o tres días se convierte ya en un azul marino.

Cuando se efectúa una dilución a gran volumen por medio de adición de agua, se forma un precipitado negruzco, de carácter esponjoso, e igualmente se origina este precipitado negruzco cuando la dilución acuosa se efectúa sobre una solución de los mismos reactivos sin vitamina D<sub>2</sub>.

Se observa asimismo que, cuando la capa azul homogénea formada en la reacción, se diluye con etanol, pasa a verdosa; en cambio, si la dilución se efectúa en una solución de sulfúrico en etanol de la mis-


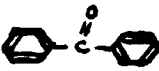
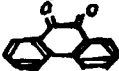
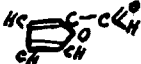
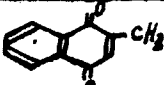
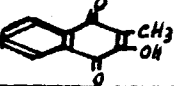
ma concentración que la total que existe en la solución productora del color azul, dicho azul permanece durante días.

Dominada ya la sistemática de una reproducibilidad de la reacción, produjéronse una serie de ensayos que solamente se diferenciaron en la cantidad de vitamina  $U_2$  presente. Llevados a un colorímetro ocular, se descubrió que la reacción estudiada sigue la ley de Beer, hecho fundamental para la realización de una buena colorimetría, y para que reconocida su importancia, tuviera objetivo práctico el continuar estudiándola.

1. 2. NECESIDAD DE UN REDUCTOR.- Reemplazando la sacarosa por las sustancias indicadas en el cuadro I, y mezclándolas con ácido sulfúrico y vitamina  $U_2$ , se obtienen los resultados indicados en dicho cuadro.

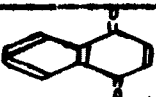

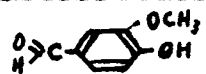

En vista de que tanto con reactivos inorgánicos como con sustancias orgánicas de la mas variada condición, se consigue el mismo re-

**C U A D R O   I**  
**Coloraciones observadas con reductores diversos**

Substancia tratada	Fórmula	Reacción en blanco	En presencia de vitamina D <sub>2</sub>
Acetona	$\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$	Rojo obscuro	Rojo obscuro
Benzaldehido		Anaranjado	Azul
Benzofenona		Anaranjado	Anaranjado
Fenantrenoquinona		Amarillo	Amarillo
Furfural		Violáceo	Azul
Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Violáceo	Azul
Maltosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Violáceo	Azul
2 metil 1,4 naftoquinona		Rosáceo	Rosáceo
2tiocol 6 2metil 3oxi 1,4 naftoquinona		Anaranjado	Anaranjado

sic.

**C U A D R O    I (continuación)**  
**Coleraciones observadas con reductores diversos**

Substancia tratada	Fórmula	Reacción en blanco	En presencia de vitamina D <sub>2</sub>
$\alpha$ naftoquinona 1,4.		Parduzco	Parduzco
P/ dimetilemino benzaldehído	$\text{H}_3\text{C} > \text{N} < \text{H}_3\text{C} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{C}(=\text{O})\text{H}$	Amarillento	Azul
p. quinona		Parduzco	Parduzco
Vainillina		Amarillento	Azul
Acido oxálico	$\text{COOH} - \text{COOH}$	Incolora	Azul
Bisulfito sódico	$\text{Na}(\text{SO}_3\text{H})$	Incolora	Azul
Pirogalol		Rosa pálido	Parda
Hipofosfito sódico	$\text{Na}(\text{PO}_2\text{H}_2)$	Blanco amarill.	Naranja



sultado, se pensó producir esta reacción por medios electroquímicos, y para ello se montó la instalación indicada en la figura I. Un acumulador genera corriente eléctrica, que se la hace atravesar una resistencia variable; a continuación se coloca un microvoltímetro, con objeto de controlar el voltaje con que se opera. El circuito se cierra mediante unos electrodos de platino introducidos en una solución de ácido sulfúrico en alcohol etílico ( 2 cc. de ácido sulfúrico en 5 cc. de etanol) que contiene asimismo 50  $\gamma$  de vitamina B<sub>2</sub>. Esta celda electrolítica se introduce en un gran baño de agua en el cual se mantiene la temperatura a 76° C. (mas adelante se expondrá detalladamente cómo se puede obtener la misma coloración azul, produciendo la reacción con los mismos reactivos, después de haber irradiado ya éstos su calor de dilución, siempre que se les suministre suficiente energía exteriormente). Verificados los ensayos con voltajes diferentes (de 0,25 a 1,50 voltios) en todos ellos se observa el mismo fenómeno, que en el cátodo se desprenden unas burbujas incoloras

de hidrógeno, mientras que en el ánodo, se desprende un barro parduzco, que poco a poco va cubriendo el fondo de la cubeta. Esta gran masa parda se origina igualmente en ausencia de vitamina  $D_2$ , al operar en las mismas condiciones.

### 1. 3. NECESIDAD DE UN DESHIDRATANTE Y DE UN GENERADOR PROTONICO.-

A continuación se investigó la naturaleza de la función ejercida por el ácido sulfúrico, la cual podría provenir de algunas de sus propiedades: ácido, deshidratante, oxidante o ión sulfato. Realizando las experiencias expuestas en el cuadro II, queda fijada dicha naturaleza. (Ninguna de las reacciones descritas en el cuadro II producen coloración efectuadas en ausencia de vitamina  $D_2$ ).

## C U A D R O    I I

**Coloraciones observadas con sustancias diversas**

Substancias reaccionantes	En contacto de vit. B <sub>2</sub>
Furfural, HCl y etanol	Azul verdoso débil a los 30°
Furfural, ZnCl <sub>2</sub> , HCl y etanol	Violeta → azul
Furfural, ZnCl <sub>2</sub> y etanol	Incoloro
Furfural, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , CH <sub>3</sub> COOH (glac.) y etanol	Incoloro
Furfural, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , CCl <sub>3</sub> COOH y etanol	Incoloro
Furfural, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , HCl y etanol	Violeta → azul
Na(SO <sub>3</sub> H), ZnCl <sub>2</sub> , HCl y etanol	Azul verdoso
COOH-COOH, ZnCl <sub>2</sub> , HCl y etanol	Azul verdoso
SnCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , HCl y etanol	Azul verdoso
SnCl <sub>2</sub> , AlCl <sub>3</sub> y etanol	Azul verdoso débil

1. 4. INFLUENCIA DEL DISOLVENTE.- Comprobada ya la necesidad de la presencia en la reacción, de un reductor, de un ácido fuerte y de un deshidratante, se consideró la función del alcohol etílico; para ello se substituye el etanol por otras sustancias análogas. Se efectúan ensayos con los alcoholes siguientes: Metílico, etílico, isopropílico, n. butílico, isobutílico, amílico, isocamílico, octílico y benecílico, en presencia de furfural y ácido sulfúrico. Todos estos alcoholes, en presencia de vitamina  $B_2$ , producen una fuerte coloración azul, y en su ausencia, coloración violeta; pero en el benecílico, además de observarse estas coloraciones, se efectúa una fuerte reacción exotérmica, con producción de un precipitado esponjoso de color blanco y desprendimiento gaseoso asimismo de blanca coloración. Posteriormente, a las pocas horas, se va cuajando el líquido sobrenadante, siendo este nuevo precipitado ligeramente coloreado, pero de un color indefinido, y este fenómeno se origina de igual modo en presencia que en ausencia de la vitamina  $B_2$ , y hasta en ausen-

cia de furfural. En los ensayos con furfural, a las 24 horas pasa el todo a una masa negruzca, y en los ensayos realizados solamente en presencia de sulfúrico y alcohol benecílico, en igual número de horas está todo en conjunto precipitado. Este precipitado es amarillento y de naturaleza mas fluída que el anterior, recordando su aspecto al de la glicerina.

Se ensayó también ácido acético glacial como disolvente de la vitamina  $D_2$  y del furfural, añadido ácido sulfúrico, y calentado el total 10' en un termostato a 74° C. se obtienen las mismas coloraciones de siempre azules y violáceas.

1. 5. ENSAYOS TERMICOS.- a) Temperatura de formación. Se mezcla una disolución etanólica de ácido sulfúrico con una gota de disolución etanólica de furfural y con otra gota de disolución etanólica de vitamina  $D_2$  (estas dos últimas soluciones se encuentran saturadas respecto a las sustancias en ellas disueltas). En esta mezcla, al re-

lucirse a un mínimo el calor de dilución que corrientemente produce el ácido sulfúrico, permite observar si se produce la reacción a la temperatura de 0° C. (rodeado de hielo el matraz en que se efectúa la mezcla). En una hora de observación, no se advierte en ella la mas mínima coloración. Se realizan con la misma mezcla una serie de ensayos en un termostato, efectuando cada ensayo con un incremento de 10° C. sobre el anterior, no observandose en ninguno de ellos, producción de color, ni en el realizado a 70° C.. Al estar este último ensayo ya muy próximo a la temperatura de ebullición del etanol, se realizan los siguientes ensayos con una variación de 2 en 2 grados. Al efectuado a 78° C. dió una coloración azul. Verificados otros ensayos sin vitamina D<sub>2</sub> dan el mismo resultado. Resumiendo, mientras la temperatura es inferior a 78° C., el producto resulta incoloro; a dicha temperatura, se colorea de azul en presencia de vitamina D<sub>2</sub> y de violeta en su ausencia.

b) Variación térmica.- En un termostato a 78° C. se introduce un

tubo de ensayo con solución etanólica de sulfúrico, al cabo de unos minutos se añade una gota de disolución etanólica saturada de furfural y vitamina B<sub>2</sub> conjuntamente. En el acto, se observa en el termómetro introducido en la mezcla reaccionante, la temperatura de 79° C. Se observa también que cuando la reacción se efectúa en el termostato, la coloración obtenida en los primeros minutos no es tan intensa como la originada adicionando normalmente el ácido sulfúrico a la solución etanólica.

1. 6. INFLUENCIA DE LA LUZ.- Se realizan cuatro ensayos en las siguientes condiciones: Un primero, expuesto directamente a los rayos solares, el tubo con la reacción. Un segundo, en la penumbra. Un tercero, en la cámara oscura, expuesto a la luz de una lámpara eléctrica, y un cuarto ensayo sin la menor cantidad de luz. A los sesenta minutos de haberse efectuado<sup>en</sup> los cuatro ensayos el contacto de las soluciones de furfural y vitamina B<sub>2</sub> con el ácido sulfúrico.

se introducen los cuatro tubos en un celofotómetro, y se observa que no existe la menor variación en la corriente eléctrica generada por cada uno de ellos.



## 2 Reactivos y aparatos empleados.

Efectuado el anterior estudio sobre la marcha de la reacción, se fijan unas condiciones determinadas con objeto de poder realizar un estudio cuantitativo.

2. 1. NATURALEZA DE LOS REACTIVOS.- El alcohol etílico que se utiliza en todos los trabajos, se destila previamente para su purificación; luego se le transforma en alcohol absoluto, siguiendo la técnica de Miltz (B 4 y K 2), que consiste en tratar el alcohol con óxido cálcico a reflujo durante 14 horas, y a continuación, una simple destilación. Al reflujo se efectúa en baño de maría y a la presión ordinaria, tratando 5 Kgs. de  $\text{CaO}$  por cada Kg. de agua presente en el alcohol; esta cantidad es un 50 % mayor que la precisada teóricamente, para que la Ley de acción de masas realice la reacción en su totalidad. Una vez efectuada la obtención del alcohol absoluto, se le guarda cerrado herméticamente hasta el momento de su utiliza-

sión, para que fuera del contacto atmosférico no sufra posteriores hidrataciones, y con ello alteraciones en los resultados.

El furfural, al llegar al laboratorio se encontraba de color rojo debido a su polimerización; para purificarlo se le trata durante 30' a reflujo con carbón en polvo, y a continuación se le destila en baño de aceite. Desde la primera a la última, todas las gotas del destilado resultan completamente incoloras. Recién efectuada la destilación, se pesa la cantidad obtenida y se disuelve en alcohol. Esta solución, después de transcurridos muchos meses sigue incolora, como es de esperar, estando el furfural purificado según describen Udransky y Muell (U 1) (B 10).

La vitamina B<sub>2</sub> utilizada, se reorristaliza en acetona consiguiéndose cristales blancos de punto de fusión 128, - 128,5° C. Realizada su disolución alcohólica, se preserva también de la acción de la luz y del oxígeno encerrándola en frasco tapado y en sitio fresco; de este modo, durante todo el tiempo que dura la investigación, per-

manece incolora.

El ácido sulfúrico empleado, de densidad 1,839 y completamente incoloro.

2. 2. SOLUCIONES PREPARADAS.- La solución etanólica de vitamina D<sub>2</sub> se prepara efectuando primeramente una solución madre de 0,01 grs. de vitamina en 100 cc. de etanol; parte de esta solución sirve de base para formar otras dos nuevas soluciones, de concentraciones 0,1 y 0,01 respecto de la primera.

La concentración de la solución furfuralica con que se opera es de 1 gr. de furfural en 100 c.c. de alcohol etílico.

La solución sulfúrica es la resultante de disolver (con lenta agitación, para no producir ebulliciones alcohólicas) 100 cc. de ácido sulfúrico en 250 cc. de alcohol.

2.3. MATRACES, PIPETAS Y SOPORTE.- Para realizar la reacción,

se utilizan siempre unos matracitos de fondo plano de 50 cc. de capacidad y 4 mm. de  $\phi$ ; y cuello, de 8 cm. de longitud y 1,5 cm. de  $\phi$ , lo cual permite efectuar la agitación en mejores condiciones que en las que se hubiera operado utilizando tubos de ensayos. El cuello de los matraces es suficientemente largo para evitar proyecciones.

Las pipetas utilizadas, debidamente contrastadas, son siempre las mismas; una de 0,2 cc. para medir la solución vitamínica, otra de 0,5 cc. para añadir la solución furfurálica, otra de 2 cc. para agregar alcohol, otra de 1 cc. para el ácido sulfúrico y otra de 5 cc. para la disolución sulfúrica.

Con objeto de que al añadir las dos últimas soluciones, el goteo se efectúe del modo mas isócrono posible, se utiliza el soporte representado en la figura 2, de uso no muy corriente hasta ahora. Consiste en un depósito cuyo volumen se gradúa a voluntad por medio de una manilla giratoria guarnecida interiormente de mercurio, para pro -

ducir cierre hermético; por el otro extremo, se une a la pipeta por medio de una goma. Al aumentar su capacidad y disminuir la presión del aire en él encerrado, se efectúa la aspiración de la solución.

2. 4. CELOFOTOMETRO, CUBETAS Y FILTROS.- El celofotómetro utilizado en este trabajo, representado en la figura 3, es de la marca Klett Summerson. Consta de dos lámparas fotoeléctricas perfectamente compensadas, y su circuito eléctrico está basado en el principio potenciométrico que elimina la provisión de baterías o de regulador de corriente constante, puesto que no le influyen las fluctuaciones de intensidad de la luz. Se conecta con la red, intercalando un voltímetro y un elevador-reductor que deje paso a una corriente de 110-120 voltios. Colocado el filtro conveniente en la ranura F, con el mando A se lleva a cero la escala B, se centra el dispositivo U una flechita que se desplaza por él mediante el mando D. Se conecta con la red, por medio de la llave H se enciende la bombilla

que se encuentra en  $w$  (esta llave está situada de tal forma que no puede encenderse la bombilla, si previamente no se ha colocado el filtro en su lugar; esto tiene por objeto el que nunca pueda estropearse el aparato por introducirse en él excesiva luz). A continuación se cierra el circuito de las lámparas por medio de la llave  $J$ . En la ranura  $I$ , se coloca una cubeta que contenga el líquido que se vaya a tomar como patrón de comparación, con transmisión conocida. La flecha sita en  $U$ , con la menor cantidad de luz que recibe ahora, se desplaza hacia la derecha del observador. Se restituye al centro con el mando  $K$ . Ahora, cambiando la cubeta patrón por la que contenga la solución que se vaya a medir, ésta, mas coloreada que la anterior, hará que vuelva a girar hacia la derecha la flecha indicadora del circuito  $U$ . Se restituye al centro con el mando  $A$ , y cuando en él se halie, se lee el número que esté indicado en la ranura  $B$ . Como la escala que se lee en  $B$ , está espaciada logarítmicamente, el número leído representa la densidad óptica. La lectura de la escala es

directamente proporcional a la concentración de la sustancia que se quiere determinar; por tanto, hallada la constante que entra en dicha ley ( $\lg T_0 / T = \text{densidad óptica} = \text{constante} \times \text{concentración}$ ), con sólo efectuar dos medidas de concentraciones conocidas, las operaciones futuras se reducen a una división si se hace uso de la constante o factor de multiplicación, o en su defecto, a la siguiente regla de tres: concentración conocida es a lectura conocida, como concentración desconocida es a lectura desconocida. Este último método es similar al usado en el colorímetro visual, excepto que la lectura es directamente proporcional a la concentración en vez de serlo inversamente. La escala que gira por B está graduada de 0 a 1000.

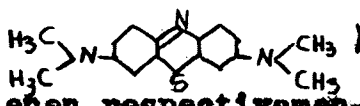
Las cubetas del aparato, todas perfectamente homogéneas en cuanto a la luz que absorben, están aforadas a los 5 y 10 cc. la primera de estas cantidades es la mínima que puede manejarse, pero para mayor seguridad, se emplean siempre 6-7 cc., con lo cual se rebasa el margen preciso, y no se gasta reactivo innecesariamente. (No debe asus-

asustar esta indeterminación en cuanto al volumen de solución existente en la cubeta. La reacción se realiza en matraces con 7cc. en total de líquidos en presencia, de donde se le trasvasa a las cubetas de media; como esta operación se realiza rápidamente y la viscosidad del líquido es mediana, es natural que unas veces saiga mayor volumen que otras; pero como un exceso de volumen sobre el de 5cc. es indiferente a la corriente generada, de ahí que sea poco importante la cantidad de líquido encerrado en dichas cubetas).

El filtro que menos absorbe las radiaciones necesarias para el objetivo perseguido, es el rojo, y con él se realizan todas las medidas.

2. 5. SOLUCIONES HITOS.- Las soluciones que presentan una densidad óptica mayor de 400 frente al patrón que se utiliza, son inaptas para determinaciones cuantitativas, porque en esas zonas están muy próximas las divisiones de la escala del colorímetro. En vez de efectuar diluciones, que dan lugar a errores, y habida cuenta que los reacti-



vos en blanco, en las mismas condiciones, también originan color, variable con el tiempo, no se pueden utilizar las técnicas colorimétricas normales. Se obvian estos inconvenientes realizando las determinaciones de la siguiente forma: Se tienen preparadas, y a la vista, cuatro soluciones acuosas de azul de metileno (  ) que se denominan patrones 2, 3, 4 y 5, que contienen respectivamente 0,1, 1, 10, 100 mgs. de dicha substancia. Se fijan precisamente estas concentraciones porque sus densidades ópticas relativas, así como la del 2 frente al agua bidestilada, son menores que el límite de 400 que impone el colorímetro. El procedimiento a seguir es el siguiente: Una vez efectuado un ensayo con la reacción, se observa visualmente cual de los patrones es el inmediato inferior en intensidad, y este patrón se toma de cero en el colorímetro. Se halla la densidad óptica de la reacción frente a este patrón y a continuación se determina la densidad óptica de dicho patrón frente al agua bidestilada (puesto que las intensidades de substancias coloreadas tan es-

tables como el sulfato cúprico acuoso y el azul de metileno cambian con el tiempo). La suma de estas cantidades representa la densidad óptica absoluta de la reacción, a cuya densidad se refieren todos los números indicados en el presente trabajo.

### 3 Técnica de la reacción

La técnica que se utiliza siempre en la obtención de la reacción, es la siguiente:

- 1º Se introduce en el matraz la solución etanólica de vitamina D<sub>2</sub>.
- 2º Se añade 0,5 cc. de la solución etanólica de furfural.
- 3º Se adiciona alcohol etílico hasta completar un volumen de 2,5cc.
- 4º Se vierte durante un minuto un cc. de ácido sulfúrico, procurando que el tiempo transcurrido entre la introducción de dos gotas cualesquiera sea el mismo (se utiliza el soporte ya descrito). En el momento de acabar de echar el ácido, se agita con cuidado hasta la homogeneización del líquido (entonces se observa la sucesión de colores rojo → violeta → azul). A continuación se coloca en el soporte una pipeta de 5 cc. llenándola con la disolución de ácido sulfúrico en etanol.
- 5º Transcurridos dos minutos exactos de haber terminado de verter

el ácido sulfúrico, y durante un minuto justo, se introduce en el matraz la disolución sulfúrica, procurando como anteriormente, que caigan las gotas de la forma mas isócrona posible. Al terminar el minuto, se agita. Se trasvasa el líquido coloreado que se haya obtenido, a la cubeta del colorímetro; se coloca ésta en su sitio y se ajusta la flecha C en el centro por medio del mando A.

6º.- A los dos minutos justos de haber concluido de verter sobre el matraz la disolución sulfúrica, se realiza la lectura. (Hasta el momento de la lectura, se debe tener oculta la escala B, para no producir un error personal motivado por sugestión, al tener ya previsto aproximadamente el número que se va a obtener).

#### 4. Ensayos con vitamina $D_2$ aislada

y estudio de los errores que se pueden cometer en su análisis

4. 1. OBTENCION DE LA CURVA DE CALIBRADO.- En las condiciones ya expuestas, se determinan las densidades ópticas surgidas a través de ensayos, que solamente se diferencian en las cantidades de vitamina  $D_2$  que encierran. Durante la obtención de estas medidas, la densidad óptica de una de las soluciones patrón frente a la siguiente, de menor concentración, es de 315; y 50 la del patrón 2, frente al agua bidestilada.

Con objeto de disminuir el error personal en cada determinación, se realizan cuatro lecturas en cada ensayo. La primera, al minuto justo de finalizar la adición de la solución sulfúrica, y las tres siguientes, con 60" de retraso una de otra. Así queda mas seguro el número obtenido a los dos minutos que, como ya se ha manifestado, es

el que se registra. Se copia del cuaderno de laboratorio la forma en que se recogen los datos de cada determinación:

Cantidad empleada de vit. $D_2$ en	Comienzo de la reacción	Minutos de observación	Densidades ópticas observadas
1	20'	21'	88
18-138 f agua		22'	88
		23'	88,5
violeta	2	24'	89
Coloración final observada	Patrón tomado de cero		

Realizadas varias determinaciones con diferentes cantidades de vitamina  $D_2$ , se obtienen los resultados expuestos en el cuadro III. Representados estos valores gráficamente, producen la curva expuesta

**CUADRO III**  
**Medidas verificadas para la obtención de la curva de calibrado**

Vit. B <sub>2</sub> en $\gamma$	Mensidades ópticas observadas	Mensidades ópticas calculadas	Vit. B <sub>2</sub> en $\gamma$	Mensidades ópticas observadas	Mensidades ópticas calculadas
0	131,5	132,0	30	391,5	393
1	133	137,2	40	335	340
2	142	142,4	50	401	392
3	149	147,6	60	445,2	444
4	152,7	152,8	70	503	496
5	159	153,0	80	556	543
6	161	165,2	90	615	600
7	163,5	165,4	100	640,7	632
8	172	173,6	125	775	732
9	177	173,8	150	900	912
10	184,5	184,0	175	1023	1042
20	232	236,0	200	1040	1172

en la figura 4 (en ordenadas, número de  $\gamma$  de vitamina  $B_2$ ; y en abscisas, número de densidades ópticas frente a la del agua bidestilada). Los valores calculados a partir de ella, mas verdaderos que los observados, están también indicados en el cuadro III. Restado el valor del "cero", se observa: que a un incremento de 100  $\gamma$  de vitamina  $B_2$  le corresponde un incremento de 580 de densidad óptica frente al agua; por tanto, a un incremento de 1 de densidad óptica equivale a un incremento de 0,182  $\gamma$  de vitamina  $B_2$ ; luego éste será el factor de calibración, y bastará multiplicarlo por la densidad óptica obtenida, restada previamente de 132, para obtener el número de  $\gamma$  de vitamina  $B_2$  presente.

De 0 a 50  $\gamma$ , el color del líquido obtenido es violeta; de 40 a 100  $\gamma$  va azuleando cada vez mas; y con mas de 100  $\gamma$  es francamente azul. Como la cantidad de furfural presente en todos los ensayos (origen de la coloración violeta) es de 5000  $\gamma$ , se observa cuánto mas enérgica es la coloración debida a la vitamina  $B_2$  (unas 50 veces).



4. 2. VARIACION DEL FURFURAL.- Con objeto de ampliar los conocimientos sobre la reacción, y con el de fijar el error posible que puede surgir a causa de una inexactitud en la cantidad de furfural añadida, se examina la influencia que origina en el resultado colorimétrico el uso de una distinta cantidad de furfural en cada ensayo.

En el cuadro IV se reseñan estos ensayos, en ellos a excepción de las cantidades utilizadas de furfural, las de los demás componentes son las ya fijadas. Llevados estos resultados experimentales a la figura 5 (en ordenadas mgs. de furfural y en abscisas densidades ópticas frente al agua), y colocados en ella los puntos ya comprobados en la curva de la figura 4, o sea el número resultante de efectuar la reacción con 0, 10, 20, 30  $\gamma$  de vitamina B<sub>2</sub> con 5 mgs. de furfural en condiciones normales, se obtienen las curvas correspondientes.

4. 3. VARIACION DEL ACIDO SULFURICO.- Este estudio lo motivan las mismas causas que impulsaron a realizar el anterior del furfural. Los

## CUADRO IV

Estudio de la variación del furfural

Vit. D <sub>2</sub> en $\gamma$	Furfural en mgs.	Densidades ópti- cas observadas	Densidades ópti- cas calculadas	Coloraciones obtenidas
0	2,5	82,5	84,75	violeta
0	7,5	181	179,25	violeta
10	0	37	37,50	incolora
10	2,0	96	96,10	azul
10	3,5	139	140,05	azul
10	4,0	167,7	169,35	violeta
10	5,5	200	198,65	violeta
10	6,5	229,5	227,95	violeta

etc.

**CUADRO IV (continuación)**  
**Estudio de la variación del furfural**

Vit. D <sub>2</sub> en γ	Furfural en mgs.	Densidades ópti- cas observadas	Densidades ópti- cas calculadas	Coloraciones obtenidas
10	8	274	271,90	violeta
10	9,5	312	315,85	violeta
20	2,5	139	136,75	azul
20	7,5	348	335,25	violeta
30	2,5	160,5	162,75	azul
30	7,5	392	375,75	violeta
100	0	37,5	37,5	incolora

resultados obtenidos son los expuestos en el cuadro V (todos estos ensayos se efectúan con 5 mgs. de furfural. Las cantidades de ácido sulfúrico que en él se citan, no son las totales existentes en cada determinación, sino las introducidas primeramente, o sea, las causantes de la reacción, y no las que se agregan disueltas en alcohol). Estos resultados están representados gráficamente en las figuras 7 (en ordenadas, cc. de ácido sulfúrico y en abscisas densidades ópticas frente al agua) y 8 (en ordenadas  $\gamma$  de vitamina  $D_2$  y en abscisas densidades ópticas frente al agua).

4. 4. VARIACION DEL AGUA.- Se estudia la influencia que ejerce el agua en la reacción. Para ello se realizan las experiencias descritas en el cuadro VI, todas ellas están efectuadas con 5 mgs. de furfural y 1 cc. de ácido sulfúrico. Los diversos alcoholes se preparan a partir de etanol absoluto y de agua bidestilada, por el método del cuadrilátero. Los ensayos se verifican de tal manera que la solución

## CUADRO V

Estudio de la variación del ácido sulfúrico.

Vit. D <sub>2</sub> en γ	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en cc.	Densidades ópti- cas observadas	Densidades ópti- cas calculadas	Coloraciones obtenidas
10	0	16,5	16	incolora
10	0,25	21	21	incolora
10	0,50	34	34	incolora
10	0,60	45,2	45	verde
10	0,70	64	63	verde
10	0,80	90	90	verde
10	0,90	123,5	123	violeta
10	1,10	267	270	violeta
10	1,20	386	400	violeta
10	0,60	40	40	verde

sic.

**CUADRO V (continuación)**

**Estudio de la variación del ácido sulfúrico.**

Vit. $D_2$ en $\gamma$	$H_2SO_4$ en cc.	Densidades ópti- cas observadas	Densidades ópti- cas calculadas	Coloraciones obtenidas
0	0,7	56	55	verde
0	0,8	75 <sub>2</sub>	75	verde
0	0,9	100 <sub>2</sub>	100	violeta
0	1,1	172	172	violeta
20	0,7	72,5	72	verde
20	0,8	104,5	105	azul verdoso
20	0,9	146	146	violeta
30	0,7	81,5	80	verde
30	0,8	122	120	azul

sic.

G U A D A L U P E (continuación)

Estudio de la variación del ácido sulfúrico

Vit. D <sub>2</sub> en γ	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en cc.	Densidades ópti- cas observadas	Densidades ópti- cas calculadas	Coloraciones obtenidas
30	0,9	171,7	169	azul violado
40	0,7	91,5	89	verde
40	0,8	133	135	azul
40	0,9	200	193	azul violado
50	0	16,5	16	incolora
50	0,5	45,5	47	verdosa
50	0,7	98,7	98	verde
50	0,8	152	150	azul
50	0,9	220	216	azul

**CUADRO VI**

**Estudio de la variación del agua**

Vit. D. en %	% acuoso del etanol	Densidades ópti- cas observadas	Densidades ópti- cas calculadas	Coloraciones obtenidas
0	5	87	87	violeta
10	5	121	120	violeta
20	5	144,5	153	violeta
30	5	188	186	violácea
40	5	231,7	229	azulada
50	5	256	253	azulada
0	10	65	66	violeta
10	10	80,2	80	violeta
20	10	104,5	106	violeta
30	10	125	126	violeta

sic.



## CUADRO VI (continuación)

Estudio de la variación del agua.

Vit. D <sub>2</sub> en γ	% acuoso del etanol	Densidades ópti- cas observadas	Densidades ópti- cas calculadas	Coloraciones obtenidas
40	10	144,7	146	violácea
50	10	164	166	azul
0	20	42	41	violeta
10	20	51,7	51	violeta
20	20	62,2	61	violeta
30	20	70	71	violeta
40	20	78,5	81	azulada
50	20	78,5	81	azulada
0	30	30	30	violeta

sic.

## CUADRO VI (continuación)

Estudio de la variación del agua.

Vit. $M_2$ en $\gamma$	% acuoso del etanol	Densidades ópti- cas observadas	Densidades ópti- cas calculadas	Coloraciones obtenidas
10	30	33,5	33	violeta
20	30	36,5	36	violeta
30	30	40	39	violácea
40	30	43,5	43	violácea
50	30	47,5	46	azulada
0	40	25	22	violácea
20	40	30	29	violácea
0	50	20,5	21	incolora
50	50	22	22	incolora

alcohólica sulfúrica que se añade con objeto de diluir el color ya formado, tenga la misma concentración acuosa que la del alcohol presente en la formación del color. Los resultados están representados en la figura 9 (en ordenadas % acuoso del etanol en volumen y en abscisas densidades ópticas frente al agua), y de esta figura se deduce la figura 10 (en ordenadas  $\chi$  de vitamina  $D_2$  y en abscisas densidades ópticas frente al agua).

4. 5. VARIACION EN EL TIEMPO.- Se considera la variación que se efectúa en el tiempo, los ensayos se realizan en condiciones normales, y sus resultados vienen expresados en el cuadro VII, y se representan en la figura 11 (en ordenadas, número de minutos transcurridos desde el momento de tener lugar la reacción y en abscisas densidades ópticas frente al agua). Llevados, estos resultados, a la figura 12 (en ordenadas  $\chi$  de vitamina  $D_2$  y en abscisas densidades ópticas frente al agua) se observa cómo varía con el tiempo la curva de calibrado,

## CUADRO VII

Estudio de la variación en el tiempo.

Vit. D <sub>2</sub> en $\gamma$	Minutos transcurridos	Densidades ópticas observadas	Densidades ópticas calculadas
0	5	132	134,4
0	10	143	139,2
0	15	144,5	144,0
0	20	150	148,8
0	25	151	153,6
0	30	157,2	158,5
10	5	189,5	187,2
10	10	193	194,6
10	15	204	201,9
10	25	207	209,3

sic.

**C U A D R O    VII (continuación)**  
**Estudio de la variación en el tiempo.**

<b>Vit. D<sub>2</sub> en <math>\gamma</math></b>	<b>Minutos transcurridos</b>	<b>Densidades ópticas observadas</b>	<b>Densidades ópticas calculadas</b>
10	25	218,5	216,6
10	30	225	224,0
20	5	242	241,0
20	10	249,2	250,8
20	15	262	260,6
20	20	273	269,7
20	25	277	280,2
20	30	287	290,0
30	5	296	293,7
30	10	303	306,0

sic.

C U A D R O    VII    (continuación)  
 Estudio de la variación en el tiempo

Vit. D <sub>2</sub> en $\gamma$	Minutos transcurridos	Densidades ópticas observadas	Densidades ópticas calculadas
30	15	315,7	318,2
30	20	333,5	330,5
30	25	347	342,8
30	30	352	355,0
40	5	343	346,5
40	10	358,5	361,5
40	15	372	376,3
40	20	394	390,8
40	25	399,5	405,5
40	30	419	420

en el sentido de ir teniendo menor inclinación, aunque cada vez sea menor el giro efectuado.

Las experiencias descritas en este capítulo descubren las modificaciones que sufre la curva de calibrado al variar los factores que la influncian. Con ello se han ampliado los conocimientos sobre la reacción, se ha expuesto una infinidad de curvas de calibrado, y se ha visto como influyen, y de que modo tan distinto, los diversos reactivos que intervienen en la reacción; por tanto al no poderse condensar en una fórmula matemática tanta variables independientes, y querer expresar la exactitud del método propuesto, se deben considerar esas causas de error junto a las restantes debidas a los aparatos y al observador. Se observa en las determinaciones ya citadas en los diversos cuadros, cómo el error absoluto va en aumento en razón directa con la densidad óptica que se lee en el colorímetro, pero que no varía por esta causa el error re-

lativo. Igualmente se observa que el error medio es de un 2%, por tanto, este será el error que se produce al fin de una sola determinación; ahora bien, si en vez de realizar solamente una experiencia, se efectúan varias en las mismas condiciones, debido a que se producen con la misma intensidad errores positivos que negativos, el error habrá desaparecido prácticamente.



### **5. Aplicación de la reacción**

**a la determinación cuantitativa de la vitamina D en aceites.**

**5. 1. VITAMINAS  $D_2$  Y  $D_3$  AISLADAS.-** Se ha estudiado hasta ahora la forma de verificar la reacción analítica de la vitamina  $D_2$  cuando ésta se encuentra en solución etanólica. Se considera ahora el caso de que se halle en una solución aceitosa de un preparado medicinal. En estas condiciones la acompañan esterinas y otras sustancias que también producen color con los reactivos empleados (N 3); por ello es necesaria la saponificación y librar de esterinas el insaponificable.

Se efectúa la saponificación (con la técnica de Santos Ruiz y Correia Balha-S-5-) a una solución oleosa de vitamina  $D_2$  e independientemente a otra solución oleosa de vitamina  $D_3$  y se separan las esterinas por el método de la digitonina (después de ensayar los dos métodos descritos en la parte teórica se emplea más del digitónido, por

su mayor rapidez puesto que, conociendo la cantidad de esterinas presentes en el aceite (B 6), se puede realizar su extracción satisfactoriamente en una sola operación). Se disuelve el residuo en alcohol absoluto y se verifica la reacción de modo normal comprobándose que:

1°.- Una cantidad determinada de vitamina  $D_2$  disuelta en alcohol produce la misma densidad óptica que otra cantidad igual de vitamina  $D_2$  disuelta en aceite y tratada en la forma descrita,

2°.- Cantidades equimoleculares de vitamina  $D_2$  y vitamina  $D_3$  originan igual número en el colorímetro.

5. 2. CON VITAMINA A EN ACEITES ANIMALES.- Al estudiar los resultados colorimétricos obtenidos con mezclas de vitamina A y vitamina  $D_3$  en unos preparados que contienen distintas cantidades relativas de estas dos sustancias (cuyo material de origen ha sido previamente saponificado y excluido de esterinas) se observa que, a medida que la relación vitamina A /  $D_3$  se va haciendo mayor, para una cierta canti-

dad fija de vitamina  $D_3$  presente, las densidades ópticas van experimentando un cierto aumento. Entonces se pensó que, si en cualquier concentración relativa, distintas cantidades presentes seguan la Ley de Beer, sus curvas de calibrado podrían resolver el problema de la determinación de la vitamina  $D$  sin necesidad de separarla de la vitamina  $A$ . Para ratificar este supuesto, prepáranse una serie de soluciones en las cuales varían las cantidades relativas de vitamina  $A$  y  $D_3$  gradualmente. Las concentraciones relativas de estas soluciones son de 20, 15, 10, 7,5, 5, 2,5, 1,25, 1, 0,75, 0,50 y 0,25 U.I. de vitamina  $A$  por 1 U. I. de vitamina  $D$  en todas ellas. En cada una de estas soluciones se realizan una serie de ensayos con objeto de determinar sus curvas de calibrado, y se comprueba que efectivamente todas cumplen la Ley de Beer, y que la variación de las inclinaciones de estas curvas va siendo menor a medida que la relación vitamina  $A/D$  se hace mayor. Los resultados obtenidos están representados en el cuadro VIII y en la figura 13 ( en ordenadas U. I. de vitamina  $D$

## CUADRO VIII

Ensayos realizados en mezclas de vitamina  $A_2$  con vitamina A

U.I. de A ante 1 U.I. de D	Un $\Delta$ de 100 densidades ópticas se corresponde con n				Un $\Delta$ de 75 U.I. de A < > a las dens. ópt. sig.
	$\gamma$ de D	U.I. de D	U.I. de A	$\gamma$ de A	
20	0,0752	3,00	69,4	23,1	108
15	0,0943	3,73	55,9	15,8	134
10	0,105	4,20	42,0	14,0	178,5
7,5	0,117	4,69	35,2	11,7	213
5	0,147	5,99	29,5	9,84	254
2,5	0,249	9,98	24,9	8,31	300,5

sic.

**C U A D R O    VIII    (continuación)**

**Ensayos realizados en mezclas de vitamina  $M_3$  con vitamina A**

U.I. de A ante 1 U.I. de D	UnΔ de 100 densidades ópticas se corresponde con R				UnΔ de 75 U.I. de A<> a las dens. ópt. sig.
	γ de D	U.I. de D	U.I. de A	γ de A	
1,25	0,451	18,04	22,5	7,51	332,5
1	0,547	21,9	21,9	7,30	341
0,75	0,713	25,5	21,5	7,13	350,5
0,50	1,01	40,7	20,5	6,79	368
0,25	1,75	70,0	17,5	5,84	428
0	10,2	768	0	0	

y en abscisas densidades ópticas frente al agua). De ella se ha obtenido la curva de la figura 14 (en ordenadas número de U. I. de vitamina A por 1 U. I. de vitamina B, y en abscisas número de U. I. de vitamina B que comprende una variación de 100 números del colorímetro). La curva de la figura 15 (en ordenadas número de U. I. de vitamina A por 1 U. I. de vitamina B, y en abscisas incremento con que responde el colorímetro, en una solución cualquiera, a un incremento absoluto de 75 U. I. de vitamina A) deducida de las figuras 13 y 14 resuelve el problema de la determinación de la vitamina B cuando ésta se encuentra junto a la vitamina A. El procedimiento seguido para dicha determinación es el siguiente:

1°.- Una vez saponificada y separadas las esterinas del aceite de que se parta, se forma con la mezcla de vitamina A y B, una solución alcohólica de volumen V; en una cierta fracción de V se analiza cuantitativamente la vitamina A presente en ella por medio de la reacción de Carr y Price, utilizando el fotómetro de Pulfrich, y expresando

el resultado en U. I. según las equivalencias encontradas por Ritsert y Daltz (D 7, R 5 y V 5).

2°.- En una cierta fracción V/n se practica la reacción estudiada en este trabajo, y se lee en el celofotómetro el resultado. Se realiza la misma operación con  $2V/n$ ,  $3V/n$ ,  $4V/n$ ,.... hasta obtener la curva de calibrado (normalmente son suficientes 6 ensayos para tener la seguridad de haber conseguido, con sus resultados, la recta de calibrado).

3°.- Obtenida la curva de calibrado, se determina en ella el incremento de densidades ópticas que corresponde a un incremento de 75 U. I. de vitamina A. Se lleva este valor a la curva de la figura 15, y la ordenada de ese punto expresa la relación A/D, obteniéndose inmediatamente, puesto que ya se ha determinado previamente la cantidad absoluta de vitamina A presente en V, la cantidad absoluta de vitamina D en V.

**§. 3. CON  $\beta$ . CAROTENO EN ACEITES VEGETALES.-** Se trata una solución alcohólica de  $\beta$  caroteno de punto de fusión  $184,6^{\circ} \text{ C}/$  con furfural y ácido sulfúrico en condiciones normales, y se comprueba que, al igual que la vitamina D y la vitamina A, el  $\beta$ . caroteno produce las mismas coloraciones, violada en pequeña cantidad y azulada en mayor. Al mismo tiempo se fija su curva de calibrado que sigue la Ley de Beer. En vista de ello se realizan de modo análogo al efectuado en las mezclas de vitaminas A y D<sub>3</sub>, una serie de soluciones alcohólicas en las que varían las concentraciones relativas de  $\beta$  caroteno y vitamina D<sub>2</sub>, para tratar de hallar alguna relación entre ellas, como sucede en el caso de las dos vitaminas. Se consideran las curvas de calibrado de las siguientes soluciones: 1 U. I. de vitamina D<sub>2</sub> por 12, 6, 3, 1,5, 0,75, 0,60, 0,45, 0,30, 0,12, 0,045, y 0,018% de  $\beta$  caroteno. Estas soluciones, teniendo en cuenta la acción biológica del  $\beta$ . caroteno, se corresponde con los siguientes valores de vitamina A en U. I. : 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 1,00, 0,75, 0,50, 0,20, 0,075 y 0,030. Estos



últimos valores son los que se mencionan en lo sucesivo. Todas las soluciones expresadas se comportan de acuerdo con la Ley de Beer, las tangentes de sus curvas de calibrado, van sufriendo menor variación a medida que va aumentando la relación  $\beta$  caroteno/ $A_2$ . Estas tangentes vienen dibujadas en la figura 16 (en ordenadas  $\chi$  de vitamina  $A_2$ , y en abscisas densidades ópticas frente al agua). Esta variación puede estudiarse mas claramente en la figura 17 (en ordenadas cantidad relativa de  $\beta$  caroteno-expresada en su equivalente de U. I. de vitamina A- en función de 1 U. I. de vitamina  $A_2$  presente, y en abscisas densidades ópticas frente al agua). Se comprueba claramente que estas curvas son del mismo tipo que las obtenidas en las mezclas de vitamina A y vitamina  $A_2$ . La curva de la figura 18, análoga a la de la figura 15, resuelve el problema de la determinación de la vitamina  $A_2$  cuando se halle mezclada con  $\beta$  caroteno. Los resultados de los distintos calibrajcs, vienen incluidos en el cuadro IX. Se observa que, lo mismo se expresen los resultados de  $\beta$  caroteno y vitamina A en  $\chi$ ,

## C U A D R O    I X

Ensayos realizados en mezclas de vitamina B<sub>2</sub> con  $\beta$ . caroteno.

$\beta$ . caroteno ( $\langle \rangle$ ) con U.I. de A) ante 1 U.I. de D	Un $\Delta$ de 100 densidades ópticas se corresponde con n				Un $\Delta$ de $\beta$ . car. ( $\langle \rangle$ ) a 75 U.I. de A) ( $\langle \rangle$ ) a las dens. ópt. sig.
	$\phi$ de D	U.I. de D	$\beta$ . car. ( $\langle \rangle$ ) U.I. de A)	$\gamma$ de $\beta$ . car.	
$\infty$	0	0	602	431	9,35
20	0,750	30,0	600	360	12,4
30	1,33	35,5	535	321	14,0
5	2,14	35,7	423	257	17,5
2,5	3,31	132	331	199	22,6
1,25	5,03	201	251	150	29,8
1	5,59	223	223	134	33,5

sig.

## C U A D R O    IX (continuación)

Ensayos realizados en mezclas de vitamina B<sub>2</sub> con  $\beta$ . caroteno.

$\beta$ . caroteno ( $\times$ ) con U.I. de A) ante 1 U.I. de B	Un $\Delta$ de 100 densidades ópticas se corresponde con B				Un $\Delta$ de $\beta$ . car. ( $\times$ ) a 75 U.I. de A) $\times$ a las dens. ópt. sig.
	$\delta$ de D	U.I. de B	$\beta$ . car. ( $\times$ ) U.I. de A)	$\delta$ de $\beta$ . car.	
0,75	6,25	250	187	112	40,0
0,50	7,50	300	150	90,0	50,0
0,25	10,0	400	80,0	48,0	95,7
0,075	15,0	600	37,7	28,6	157
0,030	17,5	702	21,0	12,6	356
0	19,2	768	0	0	

que en U. I. no coinciden ambas curvas. Ello es debido a que ambos acompañantes de la vitamina  $D_2$  no producen la reacción con la misma intensidad.

De este trabajo se obtiene la resolución del problema de la determinación de la vitamina  $D$  cuando se halle mezclada con  $\beta$  caroteno, y el procedimiento a seguir es el siguiente:

1°.- Se saponifica y se separan esterinas. Se forma con el residuo una solución alcohólica de volumen  $V$ , se valúa en una fracción de  $V$  la cantidad de  $\beta$  caroteno presente (G 1 y M 13).

2°.- Se determinan colorimétricamente, mediante la técnica dada en el capítulo 3, diversas fracciones de  $V$ , hasta conseguir la recta de calibrado.

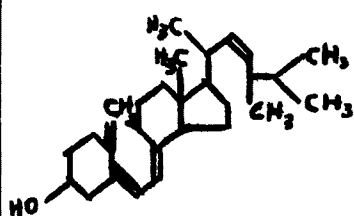
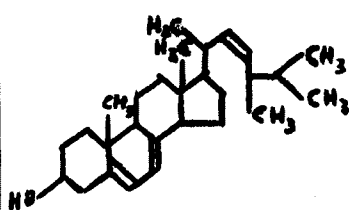
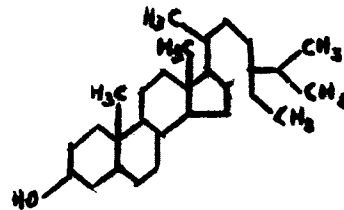
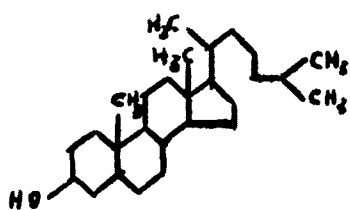
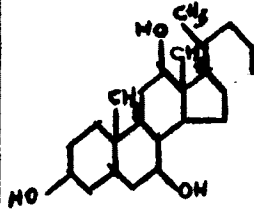
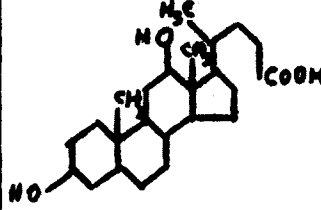
3°.- Se observa en dicha recta el incremento de densidad óptica que corresponde a una cantidad de  $\beta$  caroteno equivalente a 75 U.I. de vitamina  $A$  (en actividad biológica). Se lleva este valor a la figura 18 y la ordenada de ese punto proporciona la relación  $\beta$  caroteno/ $D_2$ , ob-

teniéndose inminentemente, puesto que ya se ha averiguado anteriormente la cantidad absoluta de caroteno presente, la cantidad absoluta de vitamina  $A_2$  que existe en la solución.

**6. Comportamiento de la reacción  
con sustancias esteroídicas análogas.**

Se preparan soluciones alcohólicas de las siguientes sustancias: Ergosterina (b) de punto de fusión  $162^{\circ}\text{C.}$ ,  $\beta$  sitosterina (c) de punto de fusión  $140^{\circ}\text{C.}$ , colesterolina (d) de punto de fusión  $149,5^{\circ}\text{C.}$ , ácido cólico (e) de punto de fusión  $193^{\circ}\text{C.}$  y ácido desoxicólico (f) de punto de fusión  $174,5^{\circ}\text{C.}$  Considérese que todas estas sustancias poseen un mismo núcleo ciclopentanoperhidrofenantrenico, aunque con distintas cadenas; y además, que contienen un grupo oxhidrilo en 3 común. (Hubiese sido de desear tratar asimismo sustancias que tuviesen bloqueado el grupo OH, pero estos ésteres son insolubles en alcohol, y por tanto no se pueden manejar en las condiciones fijadas).

Se realizan unos cuantos ensayos con cada sustancia, ( seis por lo general), y se obtienen sus curvas de calibrado, comprobándose

Vitamina D<sub>2</sub> ③Ergosterina ⑥β. sitosterina ⑤Colesterolina ④Acido cólico ②Acido desoxicólico ⑦

## CUADRO X

Estudio realizado con sustancias esteroideas análogas a la vit.  $D_2$

Substancia tratada	Fórmula empírica	Peso mol.	$\Delta$ de densi- dades ópti- cas en un $\Delta$ de 100g	$\Delta$ de $d_D$ en un $\Delta$ de 100 densidades ópticas	$\Delta$ densidades ópt. en un n°. de $\chi$ igual a su peso molar/100
Vit. $D_2$	$C_{28}H_{44}O$	396	520	19,2	20,59
Ergost.	$C_{28}H_{44}O$	396	301	33,2	11,91
Stigost.	$C_{29}H_{50}O$	414	107,5	50,6	8,17
Coolest.	$C_{27}H_{46}O$	386	218	45,8	8,41
Acido cólico	$C_{24}H_{40}O_5$	408	221	45,2	9,01
Acido dese- oxicoólico	$C_{24}H_{40}O_4$	492	63,7	157	2,49



que las coloraciones obtenidas siguen la Ley de Beer. Los resultados están expresados en el cuadro X. Los ensayos efectuados en todas estas sustancias cuyas densidades ópticas frente al agua son menores, aproximadamente, de 300, salen violáceos y con densidades mayores se van azulando. Los resultados del cuadro X vienen expresados gráficamente en la figura 19 ( en ordenadas número de veces que está contenida una cantidad de  $\chi$  igual al peso molecular/100 de cada especie química considerada, y en abscisas densidades ópticas frente al agua).

## **CONSIDERACIONES**

## 1. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS.

En la parte experimental se ha comprobado la importancia de la técnica propuesta, que permite -ya que se ajusta a la Ley de Beer- resolver el problema de la valoración de la vitamina D, bien esté aislada, o se halle mezclada con vitamita A o caroteno. Creyendo haber estudiado experimentalmente la reacción desde los mas interesantes puntos de vista, se exponen a continuación las deducciones que surgen al considerar en detalle el protocolo de laboratorio.

El primer dato obtenido sobre la substancia producto de la reacción investigada, se deriva de que al agitar conjuntamente la interfase azul con la fase alcohólica, sólo quedan unidas un corto tiempo, al cabo de el cual vuelven a diferenciarse; ello manifiesta que el producto de la reacción es insoluble en alcohol etílico, por lo que se puede presuponer que su molécula no posee ningún grupo oxhidrilo.

El hecho de que con tanta facilidad varíe el color del producto fi-

nal parece indicar que, o bien las sustancias originadas en la reacción son tan lábiles que una pequeña modificación de un agente externo es suficiente para hacerlas cambiar, o bien existen en estas condiciones varios procesos posibles, y según sean las cantidades o actividades de las sustancias en presencia, así se originan unos u otros. Como el segundo supuesto es mas fácil de observar directamente, se efectúan ensayos en los que se varía únicamente la cantidad presente de sacarosa, la graduación de la tonalidad del color resultante, junto al color lila obtenido en el ensayo sin vitamina, indica claramente que la coloración obtenida -como se suponía- es una mezcla del color producido por la sacarosa con el ácido, y del color originado por la vitamina con dichas dos sustancias; parece, pues, evidente que la segunda teoría es la verdadera, o sea, que el color total es una agregación de otros colores, y como tal, suma variable según la magnitud de sus componentes.

El hecho de que existe una correspondencia biunívoca e identidad

entre la coloración final de la solución total y la coloración predominante en la zona interfásica, manifiesta que la substancia causante de dichas coloraciones es la misma, y además, la mas intensamente coloreada de todas las restantes, puesto que su color es el que predomina al fin.

Consecuencia de que no se colorea el anillo interfásico cuando la adición de una gota de sulfúrico se realiza mucho tiempo después que la anterior -a diferencia del modo normal en el que el goteo se verifica rápidamente-. Al parecer, la única diferencia consiste en que en el primer caso no llega a poseer, el tubo de ensayo, tanta temperatura como en el segundo (por existir en el primer método mas tiempo para efectuarse la irradiación del calor producido en la dilución sulfúrica) y por tanto se puede suponer:

1°.- Que la reacción necesita una cierta temperatura para su génesis.  
(energía de activación tan corriente en las reacciones orgánicas)

2°.- Que la reacción es endotérmica y por tanto, que la mayor tempera-

tura conseguida en el segundo método aumenta el desplazamiento del equilibrio de la reacción; pero si este supuesto es cierto, como el número total de calorías obtenido en ambos métodos a lo largo del tiempo es idéntico, aún con velocidad extremadamente lenta en comparación con el segundo método, también en el primero se producirá poco a poco la reacción; como esto último no se advierte en muchos días de observación, ello indica que la reacción térmicamente considerada, o es endotérmica o exotérmica.

El hecho de que se vaya difuminando la reacción a medida que el etanol empleado sea de mayor riqueza acuosa, demuestra una vez descartada la posibilidad de que el alcohol etílico tome parte en la reacción con la totalidad de su masa -dada la cantidad de moléculas de él existentes en comparación la de las demás sustancias presentes en la reacción-, que las moléculas de agua estorban o impiden la reacción. Ello conduce a sospechar que el agua es un producto de la reacción. y su presencia la impide por efecto de la Ley de acción de masas;

en consecuencia una de las funciones que realiza el ácido sulfúrico es la de proporcionar al medio de reacción un enérgico deshidratante. En cuanto a la cuestión térmica poco puede modificarse por este cambio, puesto que el calor de disolución del ácido sulfúrico en alcohol etílico es análogo al originado al disolverse en el agua.

El fenómeno de oscurecimiento de la coloración obtenida al compás con el tiempo transcurrido -como sucede en la generalidad de las reacciones coloreadas- puede ser fruto de una nueva formación de dicha sustancia, puesto que la modificación del matiz es infinitesimal (lo cual no se encuentra en contradicción con la anterior consideración sobre el gradiente de la velocidad de la reacción, ni con la marcha general de las reacciones orgánicas). El supuesto de que se efectúe una polimerización de la sustancia formada, no es probable, puesto que por mucho tiempo que se prolongue la observación no se observa ninguna modificación en la homogeneidad del todo.

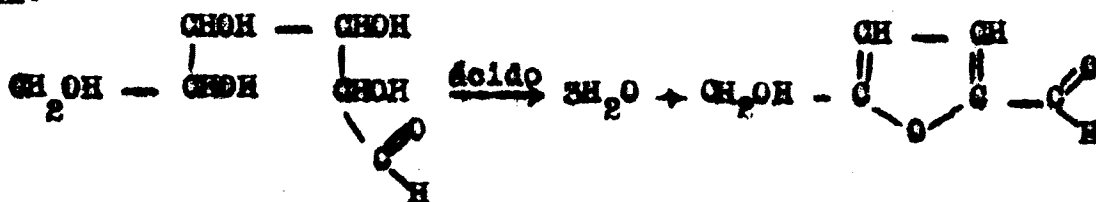
La formación de un precipitado al añadir agua a la solución final,

demuestra la insolubilidad en agua del producto de la reacción. Ello impelía a obtener la composición del producto final de la reacción operando con grandes cantidades, pero se desistió de tal empresa al considerar que la reacción en blanco -o sea, en iguales condiciones pero sin vitamina B- produce idénticos precipitados negruzcos (U 1).

En el medio tan fuertemente ácido de la reacción, la sacarosa ha de sufrir un desdoblamiento en sus exosas correspondientes, para lo cual necesita una molécula de agua;



las dos exosas formadas, d glucosa y d fructosa, encontrándose en medio sulfúrico sufren posteriormente una deshidratación, produciendo metilfurfural:



debido a que tanto las monoszas como el derivado furfurálico tienen



con el grupo  $R_1 - \text{C} \begin{smallmatrix} \nearrow \text{O} \\ \searrow R_2 \end{smallmatrix}$  se estudia el comportamiento de diversas sustancias que poseen esta característica, para lo que se opera en las mismas condiciones en que se trató la sacarosa, o sea, se preparan soluciones etanólicas 0,005 M y se les añade la solución de vitamina B<sub>2</sub> y el ácido sulfúrico. Se ensayan de este modo las siguientes sustancias: Acetona, benzaldehído, benzofenona, fenantrenoquinona, furfural, glucosa, maltosa -aunque no contiene grupo CO, debe generarlo en las condiciones expuestas igual que la sacarosa- 2metilnaftoquinona 1-4, 2metil3oxinaftoquinona 1-4, α naftoquinona, paradimetilaminobenzaldehído, paraquinona y vainillina, o sea, las mas dispares sustancias con grupo  $R_1 - \text{C} \begin{smallmatrix} \nearrow \text{O} \\ \searrow R_2 \end{smallmatrix}$ , aldehídos grasos y aromáticos, cetonas grasas y aromáticas y quinonas; pues bien, los resultados expuestos en el cuadro I no pueden ser mas concluyentes, las seis sustancias aldehídicas dan reacción positiva, y las siete que no lo son, no. Reacciones en blanco -con los mismos reactivos menos la vitamina B<sub>2</sub>- originan color violáceo las de los azúcares y furfural, y anaran-

jado las de los demás aldehidos tratados. Ante estos resultados positivos de la función aldehídica, y dado que esta función es esencialmente reductora, se ensayan otros reductores tales como ácido oxálico, pirogalol, y sulfito sódico e hipofosfito sódico -preparando, como para las anteriores sustancias, disoluciones etanólicas 0,005 M.  $\text{H}_2\text{COOH} - \text{COOH}$ , al igual que el  $\text{Na}(\text{SO}_3\text{H})$  produce en la capa ácida, el típico color rojo, y al agitar va efectuando las transformaciones conocidas, rojo  $\rightarrow$  violeta  $\rightarrow$  lila  $\rightarrow$  azul. (En ambos la reacción en blanco resulta incolora). Ante este resultado de que reaccionen de igual modo un ácido orgánico que una sal inorgánica, y para mayor convencimiento, se realizan en ellos diluciones, y al igual que lo que se ha observado en los azúcares, la dilución producida vertiendo etanol solamente sobre el azul ya obtenido, es de color verdoso, y la originada por una disolución etanólica de ácido sulfúrico, en la que la concentración del ácido es la misma que la de la solución que se va a diluir, no cambia el matiz del color, haciéndolo solamente la inten-

sidad. Este fenómeno lo producen idénticamente la reacción efectuada con ácido oxálico y la realizada con bisulfito sódico. En el otro par de reductores ensayados, aunque se obtienen una fuerte coloración, ésta no resulta azul, se justifica esta desviación por el hecho de que existan otros factores que influyen la coloración. En resumen, la función que realiza la sacarosa en la reacción, se basa únicamente en su actividad reductora.

En los intentos de producción de la reacción electroquímicamente, el hecho de originarse barros parduzcos a muy distintas diferencias de potencial, y el de que la formación de color surge en el electrodo opuesto al que se ~~se~~ espera encontrarla -y no tiene objeto pensar en una "reducción anódica"-, obligaron a abandonar la idea de realizar mas finamente la reducción, o sea, verificarla en un semielemento, -para impedir posibles interferencias entre los productos nacidos en los dos electrodos-, para ello ya se tenía comprobado frente a otro semielemento de calomelano que dicha solución conduce la corriente,

y hasta medido el potencial de la pila formada; mediante un potenciómetro (muestra + 0,17<sub>5</sub> voltios acúando el calomelano de polo negativo o sea, el voltaje total da  $(+0,24) + (+0,175) = +0,415$  voltios.

Se ha observado anteriormente que la sacarosa se transforma en furfural, por lo que en lo sucesivo se empleará esta última substancia en lugar de la primera, en todas las reacciones, con ello se eliminan aquellos procesos ya mencionados que pueden ir ligados a reacciones secundarias y además se excluye de la solución, el incremento de dos moléculas de agua que produce cada molécula de sacarosa en su conversión a furfural, evitándose así la reversibilización.

Las experiencias descritas en el cuadro II demuestran que:

- 1°.- Es necesaria la presencia de un deshidratante enérgico.
- 2°.- Para que la reacción sea positiva, se precisa la actuación de un ácido con una gran constante de disociación.

3°.- La presencia aislada de un ácido o de un deshidratante - por lo menos en la intensidad acostumbrada- no es condición suficiente

para la realización de la reacción.

4°.- La naturaleza oxidante del ácido sulfúrico no influye en la reacción -como debe suponerse habiéndose comprobado ya que en el seno de la masa reaccionante tiene lugar una reducción-.

5°/- El ión sulfato no es necesario en la reacción, puesto que sin él se origina la misma coloración.

Los ensayos verificados con distintos alcoholes demuestran que la naturaleza del alcohol presente en la reacción que se estudia no influye sobre la naturaleza del producto coloreado obtenido, (aparte del gran número de procesos químicos que pueden verificar las moléculas de ácido sulfúrico en contacto con las de alcohol etílico, originar etileno, ácido etilsulfúrico, eter dietílico, sulfato de dietilo), por tanto, el único papel que representa es el de disolvente. Se empleará en lo sucesivo como disolvente el alcohol etílico, dado que es el mas económico.

Las pruebas descritas sobre el proceso térmico de la reacción de-

dejan claramente sentado que se necesita una temperatura no inferior a 73° C. para que se produzca la reacción en estudio, y también la naturaleza exotérmica de la reacción.

Al efectuar la reacción en el termostato no toma, de momento, la solución un color tan intenso como cuando se realiza normalmente en el matraz, lo cual demuestra que en el segundo procedimiento se consigue en algunos puntos mayor temperatura de 73° C. que influye en la constante de velocidad de la reacción.

Las experiencias descritas en el capítulo primero sobre la influencia de la luz demuestran claramente que su presencia no es necesaria y que el choque una mayor o menor cantidad de fotones no influyen en su realización.

De las curvas de la figura 5 se deduce que:

El error producido al añadir una cantidad de furfural distinta de la normal origina una variación colorimétrica que sigue la ley de Beer, y puede determinarse uniendo el punto 37,5 de densidad óptica

frente al agua, con el punto que ocupa en la curva normal de calibrado una cantidad de vitamina D igual a la que existe en el ensayo considerado; por tanto el error es variable y está en función de la cantidad de vitamina presente y en razón directa y en progresión aritmética con ella. Por ejemplo: Una variación del 5 % en exceso, del furfural añadido origina con 0 % de vitamina D un incremento de 10 números del colorímetro, con 10 % 15 números, con 20 % 20 números etc. Si en lugar de los 5 mgs. de furfural que se han fijado para efectuar la reacción se emplea otra cantidad cualquiera, la curva de calibrado sigue ajustándose a la Ley de Beer aunque cambia su inclinación, debido a estar en presencia mutua dos reacciones colorimétricas, y sumarse su efecto. En la figura 6 (en ordenadas % de vitamina D<sub>2</sub>, y en abscisas densidades ópticas frente al agua) están dibujadas algunas de estas inclinaciones o tangentes. Estas inclinaciones y otras cualesquiera pueden calcularse fácilmente a partir de la figura 5. Estas figuras enseñan también cuándo resultará la reacción azul o violeta,

aunque claro está, con una cierta indeterminación en los límites de ambas zonas, puesto que siempre se producen las dos coloraciones y, por tanto, la coloración resultante es mezcla de las dos allí existentes, variando infinitesimalmente su matiz, resultando imposible precisar visualmente el límite de ambas (fenómeno visual análogo al de los puntos de fusión de las sustancias amorfas).

De las figuras 7 y 8 se deduce claramente:

1°.- Si se emplea una cantidad cualquiera, pero fija, de ácido sulfúrico, la variación producida en la reacción por haber presente distinta cantidad de vitamina  $D_2$ , se ajusta a lo dispuesto en la Ley de Beer. Las tangentes a esta serie de rectas de calibrado van variando según una curva parabólica. Varias de ellas están representadas en la figura 8.

2°.- Si la cantidad de vitamina  $D_2$ , existente en una serie de reacciones en que se vaya variando la cantidad de ácido sulfúrico, permanece fija, los resultados se ajustan a una parábola que, en la dis-



posición de la figura 7, es de eje vertical.

3°.- Según sea la cantidad de vitamina  $B_2$  que se considere, así será la curvatura de la parábola, que se irá estrechando a medida que sea mayor la cantidad de vitamina  $B_2$  empleada; por tanto a mayor cantidad presente de vitamina  $B_2$ , el error producido por la adición de un pequeño exceso de ácido sulfúrico, va tomando cada vez mayor envergadura.

Respecto al color obtenido en la reacción, también se deducen datos interesantes:

1°.- Para que la reacción se colorea es necesaria una gran cantidad de ácido sulfúrico, en comparación con las restantes cantidades de otros reactivos. Esto ratifica la necesidad de gran cantidad de  $(H^+)$  -de los dos papeles de ácido sulfúrico, como deshidratante serán precisos pocos moles, en cambio como productor de  $(H^+)$ , dado que en las condiciones fijadas está el ácido muy poco ionizado, es distinto-.

2°.- Si se emplean cantidades de ácido sulfúrico menores que las

de la curva de calibrado, la reacción resulta de color verde, lo que explica aquel cambio a color verde, observado al efectuar la dilución en medio etanólico.

3°.- Al observar la zona media de la figura 7 se comprueba que el color azul que aparece en la reacción <sup>no</sup> tiene existencia física sino que resulta de la conjunción de los dos colores presentes, verde y violeta puesto que la zona observada de color azul se encuentra entre las de los otros dos colores.

Las figuras 9 y 10 comprueban:

1°.- Una variación de la riqueza acuosa obliga a que los puntos de la curva de calibrado se trasladen siguiendo curvas parabólicas, y por tanto también se modifican así la correspondiente curva de calibrado.

2°.- La Ley de Beer sigue cumpliéndose sea cualquiera la riqueza acuosa del etanol empleado.

3°.- El agua es el mas importante de todos los factores estudiados,

puesto que un 1 % de agua representa ya una pérdida del 30 % de la coloración.

4°.- La correspondencia biunívoca observada entre el color de la reacción y el  $P_H$  de la dilución, cuando la reacción se efectúa en alcohol absoluto, se origina idénticamente cuando el alcohol contiene una riqueza acuosa cualquiera; lo que demuestra que el agua impide las dos reacciones, pero no modifica el equilibrio entre ellas. Se deduce de estas consideraciones que el control del contenido acuoso de las distintas soluciones empleadas, es de la mayor importancia.

Las figuras 11 y 12 ratifican que:

1°.- Los puntos de la curva de calibrado se desplazan a lo largo del tiempo siguiendo un mismo punto del infinito.

2°.- La Ley de Beer se sigue cumpliendo siempre, sea cualquiera el tiempo transcurrido.

3°.- Cuanto mas fuerte sea la intensidad del color, mas profunda es la variación que sufre con el tiempo.

Debido a las características del celofotómetro, cuanto mas fuerte es la intensidad del color observado, mayores errores se producen en su determinación, por desplazarse entonces la aguja del indicador con menos intensidad y mayor lentitud. Además, los errores producidos, lo mismo en la adición del furfural que en la del ácido sulfúrico son mayores cuanto mayor sea la cantidad de vitamina B presente; por tanto, para evitar estos errores, es conveniente operar con la menor cantidad posible de vitamina.

De las figuras 13 y 14 se desprende que:

1°.- La vitamina A produce también coloración con los reactivos y condiciones fijadas.

2°.- La reacción producida por la vitamina A sigue la Ley de Beer aunque no con la misma intensidad que la de la vitamina B.

3°.- Mezclas de vitamina A y vitamina B, de cualquier concentración relativa, se comportan de acuerdo con la Ley de Beer.

4°.- La tangente de la curva de Beer obtenida con mezclas de vita-

mina A y vitamina D está en función de la cantidad relativa de vitamina A respecto a la cantidad de vitamina D presente en la solución.

5°.- La variación de dicha tangente, o sea del efecto total colorimétrico, paralela a la modificación de la relación vit. A/D, sigue una curva continua.

De las figuras 16 y 17 se obtienen idénticas consideraciones que las deducidas de las 13 y 14 ya expresadas, o sea, que el  $\beta$  caroteno también reacciona en las condiciones fijadas produciendo una reacción coloreada; que dicha reacción sigue la Ley de Beer, lo que permite su valoración cuantitativa; que las mezclas de  $\beta$  caroteno con vitamina D de cualquier concentración relativa también se ajustan a la Ley de Beer; que la variación de las concentraciones relativas de estas dos sustancias origina una variación en la inclinación de la recta que refleja el resultado, y que dicha variación sigue una línea continua.

Los resultados experimentales descritos en el cuadro X, una vez

fijadas las curvas de calibrado, sirven, en primer lugar, para analizar colorimétricamente todas las sustancias allí descritas, puesto que todas siguen la Ley de Beer; y en segundo lugar para emplearlos de base en el estudio teórico que se expone mas adelante.

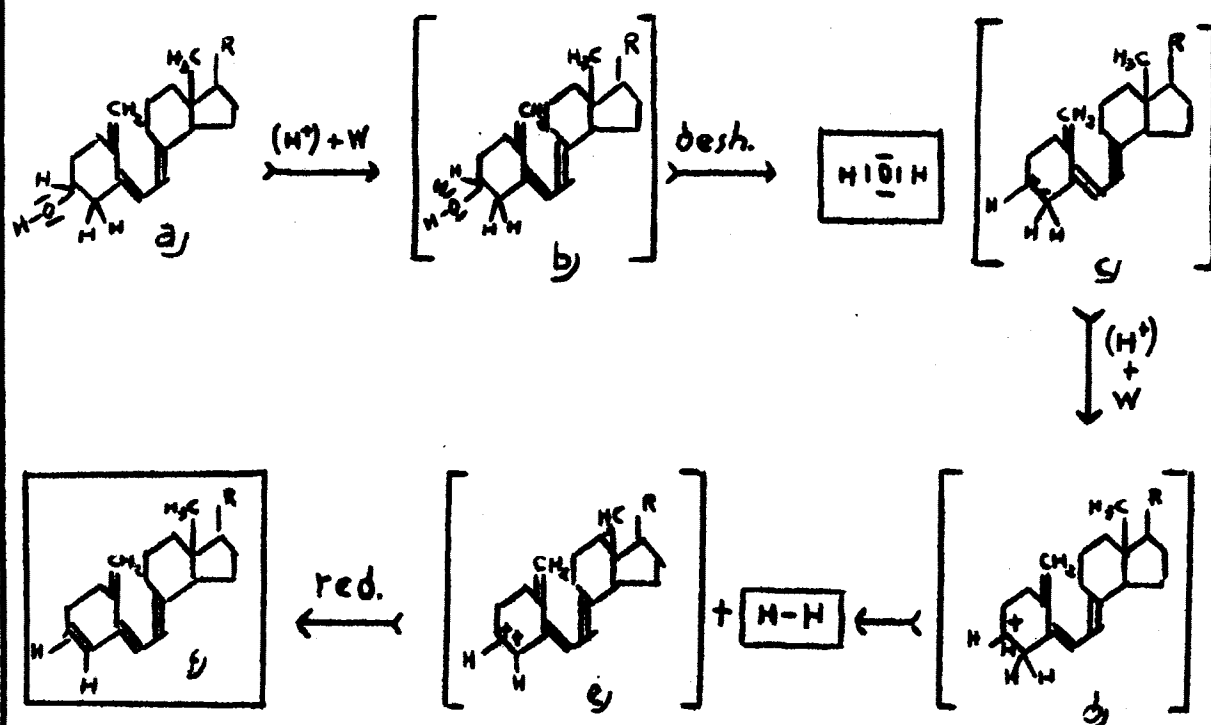
En la figura 19 se determina cómo a medida que va siendo menor el número de dobles enlaces conjugados que existen (3 en la vitamina D, 2 en la ergosterina y 0 en las demás sustancias) la reacción se va produciendo con mucha menor intensidad, ello se corresponde lógicamente con los conocimientos generales existentes sobre el color y la constitución molecular.

## 2. INTENTO DE EXPLICACION TEORICA DE LOS FENOMENOS OBSERVADOS.

En la parte experimental se ha demostrado la necesidad de un medio fuertemente ácido, de un deshidratante y de un reductor, mas la adición de una cierta energía, para que la vitamina D produzca la reacción estudiada. Se trata ahora de explicar que transformaciones pueden tener lugar en el seno de la masa reaccionante.

Se ha comprobado que diversas sustancias esteroídicas, con muy distinta cadena alifática en su molécula, originan la misma coloración. Se debe suponer, por tanto, que el fenómeno de coloración se debe a transformaciones verificadas en el núcleo ciclopentanoperhidrofenantrenico. En las vitaminas D ya no existe tal núcleo, sino el de (a) que tiene únicamente de común con las demás sustancias esteroídicas estudiadas, el grupo oxhidrilo del carbono 3; por tanto vamos a fijar - nos principalmente en él. Se puede suponer que debido a la gran can-

# Teoría expuesta sobre el mecanismo de la reacción





tidad de energía presente y al medio tan fuertemente ácido que es necesario para la producción de la reacción, uno de los muchos protones que se encuentran en él, es atraído por uno de los pares electrónicos solitarios del átomo de oxígeno y coordinado a él (b). Este compuesto colocado en un medio fuertemente deshidratante y activado al mismo tiempo por la gran cantidad de calorías que se están desprendiendo en el seno de la solución, originará la escisión de una molécula de agua, quedando el carbono 3 ionizado positivamente (c), lo que verificará que los carbonos adyacentes se carguen negativamente por inducción alternante. Ello hará que nuevos protones se acerquen al carbono 4 (d) y que alguno de ellos, de los mas activados, pueda unirse a uno de los átomos de hidrógeno, formando una molécula de H<sub>2</sub> y el compuesto (e). (Una cantidad de  $\gamma$  tan pequeña de vitamina D presente en la reacción, es de extrañar que impida observar la infinitesimal cantidad de H<sub>2</sub> desprendida -39,6  $\gamma$  de vitamina D<sub>2</sub> desprendrán 0,22 mm.<sup>3</sup> de H<sub>2</sub> a presión normal- mas, cuando el desprendimiento

se realiza a lo largo de una gran cantidad de tiempo). El compuesto (e) tendrá una existencia prácticamente instantánea, puesto que el medio fuertemente reductor proporcionará los dos electrones necesarios para su neutralización eléctrica, por lo que en el producto de la reacción (f) se habrá formado un nuevo doble enlace en conjugación con los otros tres del antiguo núcleo B. En resumen, se constituye un nuevo cuerpo con una agrupación  $H_2O$  menos y un doble enlace mas, lo que hace aumentar a cuatro el número de dobles enlaces conjugados existentes. La presencia de un doble enlace en un carbono terciario que se encuentra triplemente conjugado con otros dobles enlaces, explica que, según se genere una vibración eléctrica ante él y uno, dos o tres de los dobles enlaces que tiene conjugados, así respectivamente irá creciendo el número de formas límites isómeras, lo cual quiere decir, expresado de otra forma, que el espectro de absorción del todo, se irá desplazando hacia zonas de mayor longitud de onda, o sea, se irá oscureciendo e irá recorriendo la gama de colores observados,

lo mismo en el anillo interfásico partiendo de la fase sulfúrica a la alcohólica, que en la marcha normal de la reacción a lo largo del tiempo. El compuesto (f) será por tanto el causante de la coloración verde observada al fin de la reacción (ya se ha visto como, aunque aparece azul a la apreciación visual, la coloración del producto final obtenido, no deja de ser un error óptico, el cual es ocasionado por encontrarse presente junto al compuesto de color verde derivado de la vitamina D, el de color violeta ocasionado en la reacción independiente del furfural con el ácido sulfúrico). En él se efectúan vibraciones electrónicas entre átomos situados en tres de los antiguos núcleos esterínicos (a semejanza de los derivados trifenilmetílicos, en los que se desplaza su espectro de absorción hacia mayores longitudes de onda a medida que un nuevo ciclo bencénico entra en la mesomería del conjunto aumentando con ello el número de fórmulas límites posibles) y por tanto, es comprensible y natural que llegue a conseguirse en él la coloración verde observada. Con estas consideracio-

nes queda estudiado teóricamente el proceso existente en la reacción estudiada.

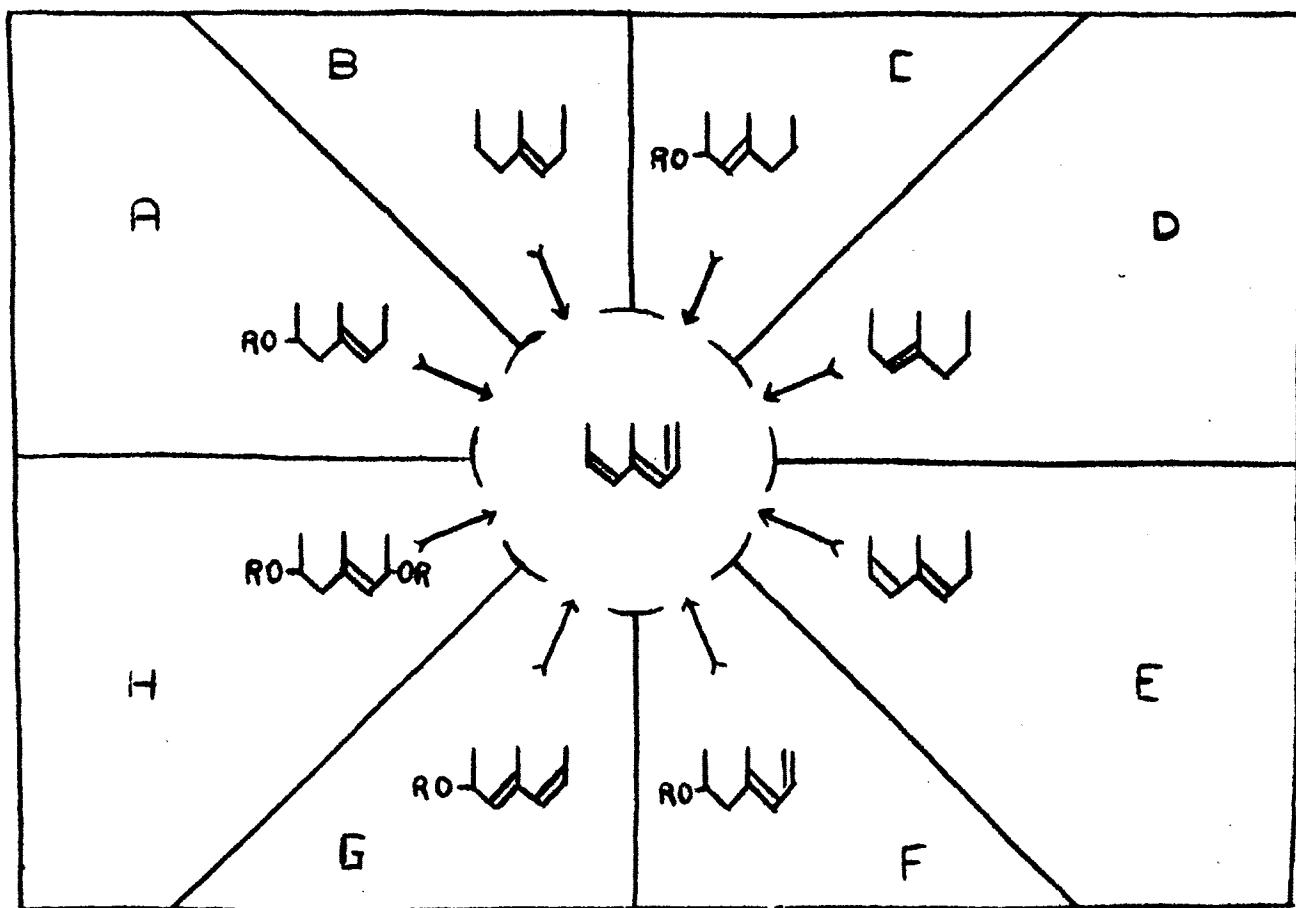
Al revisar conjuntamente las reacciones de la vitamina D, descritas en la parte teórica, a la luz de los conocimientos que se acaban de adquirir, se observa que los reactivos determinantes de cada proceso, son sustancias que poseen funciones químicas análogas a las que se ha demostrado son necesarias para que la reacción estudiada tenga lugar. Así respecto al reductor, en la reacción de Brockmann y Chen (B 7) se encuentra ~~el~~ cloruro de antimonio en presencia de cloroformo, y éste en contacto con el oxígeno del aire, reacciona produciendo fosgeno y ácido clorhídrico; por tanto ya se aprecia que el  $\text{SbCl}_3$  puede actuar de reductor en contacto con el  $\text{HCl}$ . En la reacción de Cruz Coke (C 9) también existe  $\text{HCl}$ . En la de Halden y Tzoni (H 2) se encuentra asimismo  $\text{HCl}$  y pirogallol (el tan conocido reductor fotográfico). En la de Kagi-Miescher (K 1), en su forma más típica existe bromo, que en contacto con ácido acético puede formar ácidos bromoa-

acéticos y ácido bromhídrico. En las variantes de Pottenkofer se halla en todas aldehídos (Kawaguti y Wocker (A1 y W25) emplean vainillina y furfural; Ohyama (O 1) fructosa; Scherrer (S 8) benzaldehído. En las de Liebermann-Burchard (B 11), en la de Meessenmaecker (M 3), Salkowsky (S 1), y Sobel (S 17) también se originará ácido clorhídrico a partir de cloroformo. En la de Shear (S 12) también existirá clorhídrico. En la de Noller (N 5) se halla cloruro estannoso. En la de Tortelli y Jaffé (T 7) además de bromo y ácido acético, como en la de Kagi-Miescher, cloroformo. Por tanto todas las reacciones coloreadas de la vitamina D dadas hasta hoy, cuentan con un reductor. Se puede observar igualmente y de modo mucho más fácil que todas ellas se producen en presencia de ácidos fuertes, y que al mismo tiempo que no tienen lugar en medio acuoso, se efectúan en contacto con sustancias fuertemente deshidratantes, ya sean anhídridos, ácidos concentrados o sales higroscópicas. Por otro lado, a excepción de las de Noller, Shear, Pregl y Salkowsky que producen un color rojo, y la de Brockmann, en

las restantes, por lo general, muestran al pronto una coloración roja que se va transformando en violeta, y finalmente en azul y verde; por tanto, encontrándose la vitamina D en contacto con sustancias de funciones químicas análogas, y siguiendo las coloraciones unas transformaciones paralelas, es de sospechar que estas coloraciones sean los diversos estadios de una misma transformación, esto es, que exista en todas estas reacciones y en las numerosas variantes halladas al realizar este trabajo, un mismo y único proceso de dicha vitamina.

En la bibliografía ya citada, como en este trabajo, se ha comprobado como la reacción estudiada, (aunque con ella se obtiene la determinación cuantitativa de la vitamina D), no es específica de la vitamina D, sino que es común a otras muchas sustancias esteroideas. Por consiguiente sugiere que en todas estas sustancias se produce la misma reacción, aunque claro esté, para que se realice, deben transformarse previamente en vitamina D, lo que explica el hecho observado de que cuanto mas diferente de la fórmula de la vitamina D sea la de la

esterina estudiada, menos intensamente tenga lugar la reacción; puesto que a mayores diferencias, mayor número de pasos necesitará recorrer hasta conseguir la fórmula de la vitamina. Estas transformaciones requerirán su tiempo y por tanto, en el tiempo fijado, será menor el número de moléculas portadoras de coloración, y menor también el número obtenido en el colorfotómetro. Así la ergosterina con dos dobles enlaces conjugados, -para un mismo número de moléculas- produce (cuadro X) la reacción un 42 % menos intensamente; la colesteroína y la  $\beta$ -sitosterina, con un solo doble enlace, llegan a disminuir la intensidad en un 60 %. Finalmente, el ácido demoxifóbico, sin ningún doble enlace ni grupo oxhidrilo en el núcleo B, la rebaja en un 88 %. Esto que se acaba de exponer parecen confirmarlo diversos trabajos de autores norteamericanos (E 1 y Y 1) en los que se demuestra que la acción del reactivo Liebermann sobre numerosas esterinas, origina la aparición de actividades antirraquíticas. Ello ha sido comprobado en sustancias que poseen un doble enlace en 4 o 5, con o sin grupos ox-





hidrilos, con o sin otros dobles enlaces, con o sin grupos cetónicos en tres o siete; esto es, en tipos como los descritos a continuación de A hasta H (sólo se dibujan los núcleos A y B y de modo esquemático).

## **C O N C L U S I O N E S**

1.- Se estudia una variante de las experiencias del Dr. Villar Palasi (V 2), con la que se obtiene una reacción coloreada estable de la vitamina B.

2.- Se comprueba que la reacción verificada en la vitamina B al añadirle furfural en solución etanólica y ácido sulfúrico, sigue la Ley de Beer, y por tanto, permite evaluar la vitamina B por método colorimétrico.

3.- Se establecen las condiciones en que tiene lugar la reacción del modo mas satisfactorio.

4.- Se determina que la reacción estudiada, y sus muchas variantes consideradas, es un caso particularizado de una reacción general de

la vitamina D, que se produce en presencia de un reductor, un deshidratante y un medio fuertemente ácido, al suministrar energía.

5.- Se emite una opinión sobre el mecanismo de la reacción estudiada.

6.- Se exponen unas ideas sobre la identidad del proceso existente en la mayoría de las reacciones coloreadas de la vitamina D.

7.- Se enuncia un método que permite valorar la vitamina D cuando ésta se encuentra en solución aceitosa.

8.- Se fija una técnica, mediante la que se consigue valorar la vitamina D en contacto con vitamina A, sin necesidad de separarla.

9.- Se muestra un procedimiento que efectúa la valoración de la

vitamina D junto a  $\beta$  caroteno, sin necesidad de aislarla.

10.- Se aplica la reacción estudiada a la valoración colorimétrica de  $\beta$  caroteno, colestexina, ácidos cólico y desoxicólico, ergosterina y  $\beta$  sitosterina.

11.- Se considera teóricamente el paralelismo que existe en las transformaciones verificadas en la vitamina D y en otras sustancias esteroídicas, al tratarlas con los reactivos indicados.

iiiiiiiiiiiiiiiiiiii

Verificada la lectura de la presente Memoria en el día de la fecha, el Tribunal que suscribe acordó por unanimidad concederle la calificación de sobresaliente.  
Madrid, 8 de febrero de 1950.

Antoni E. J. J. J.

J. J. J. J.

J. J. J. J.

J. J. J. J.

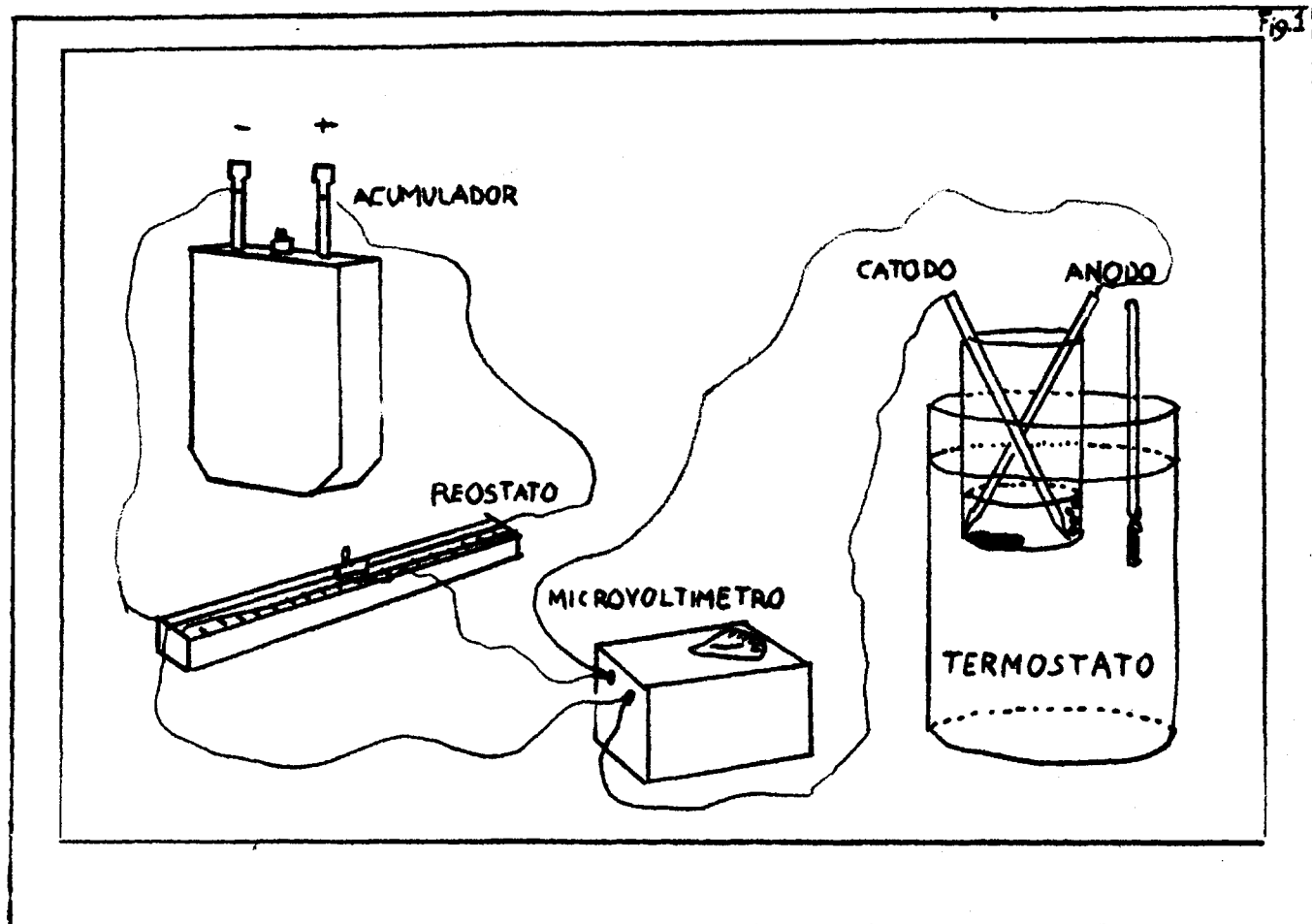
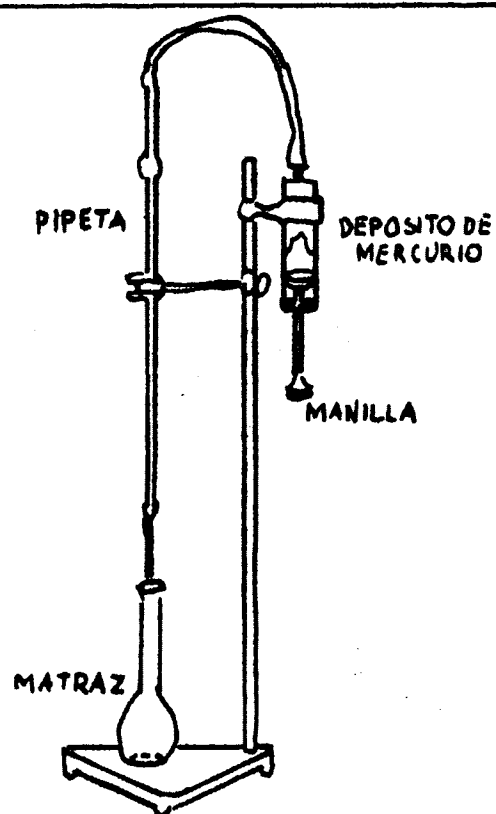
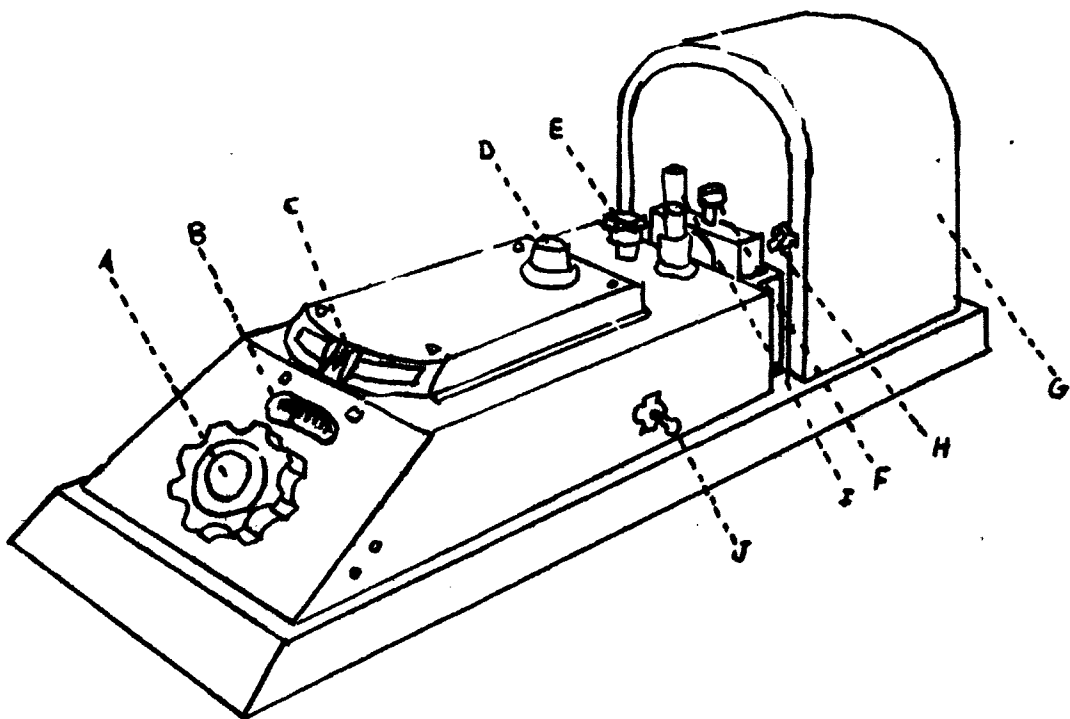


Fig. 2

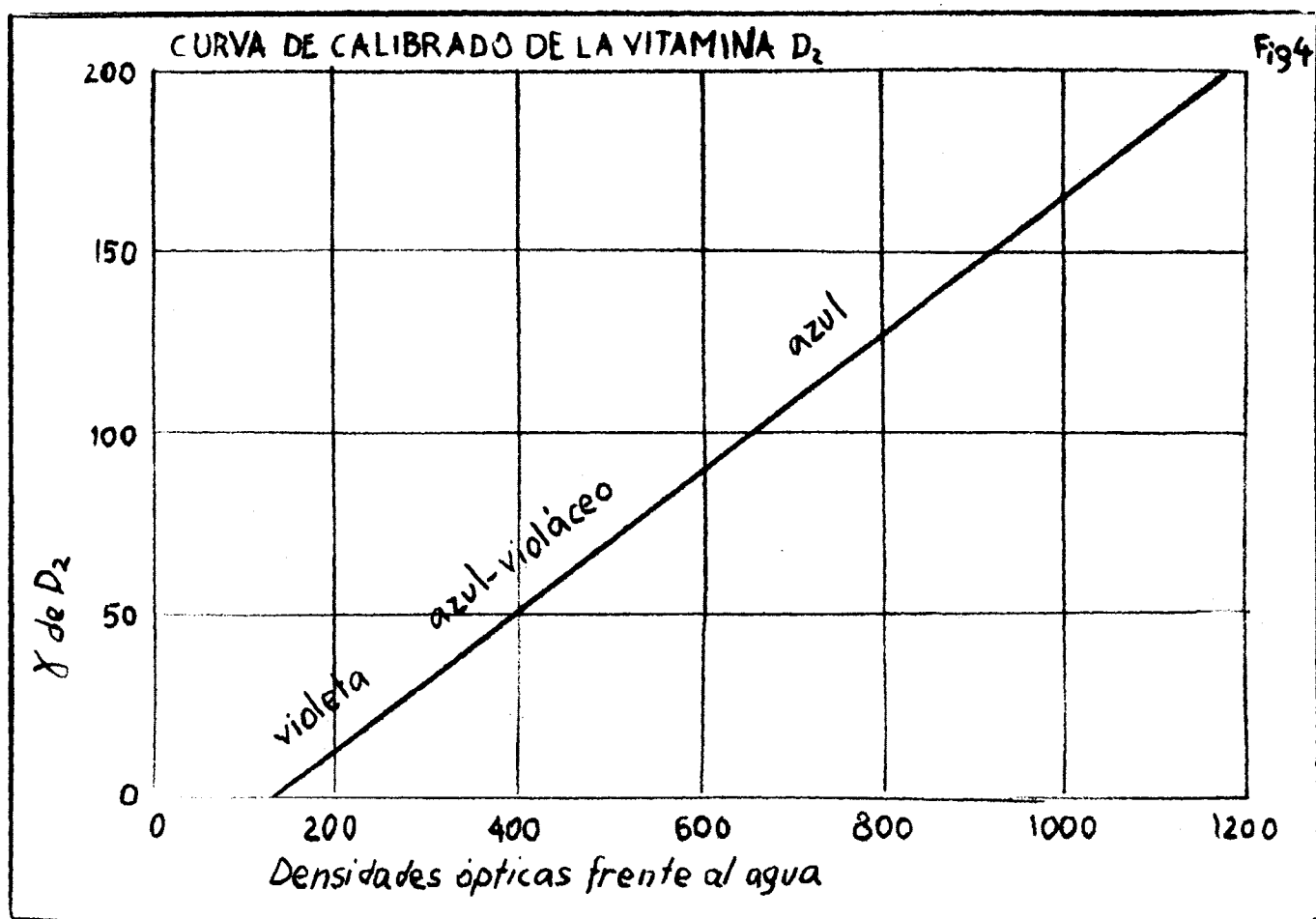


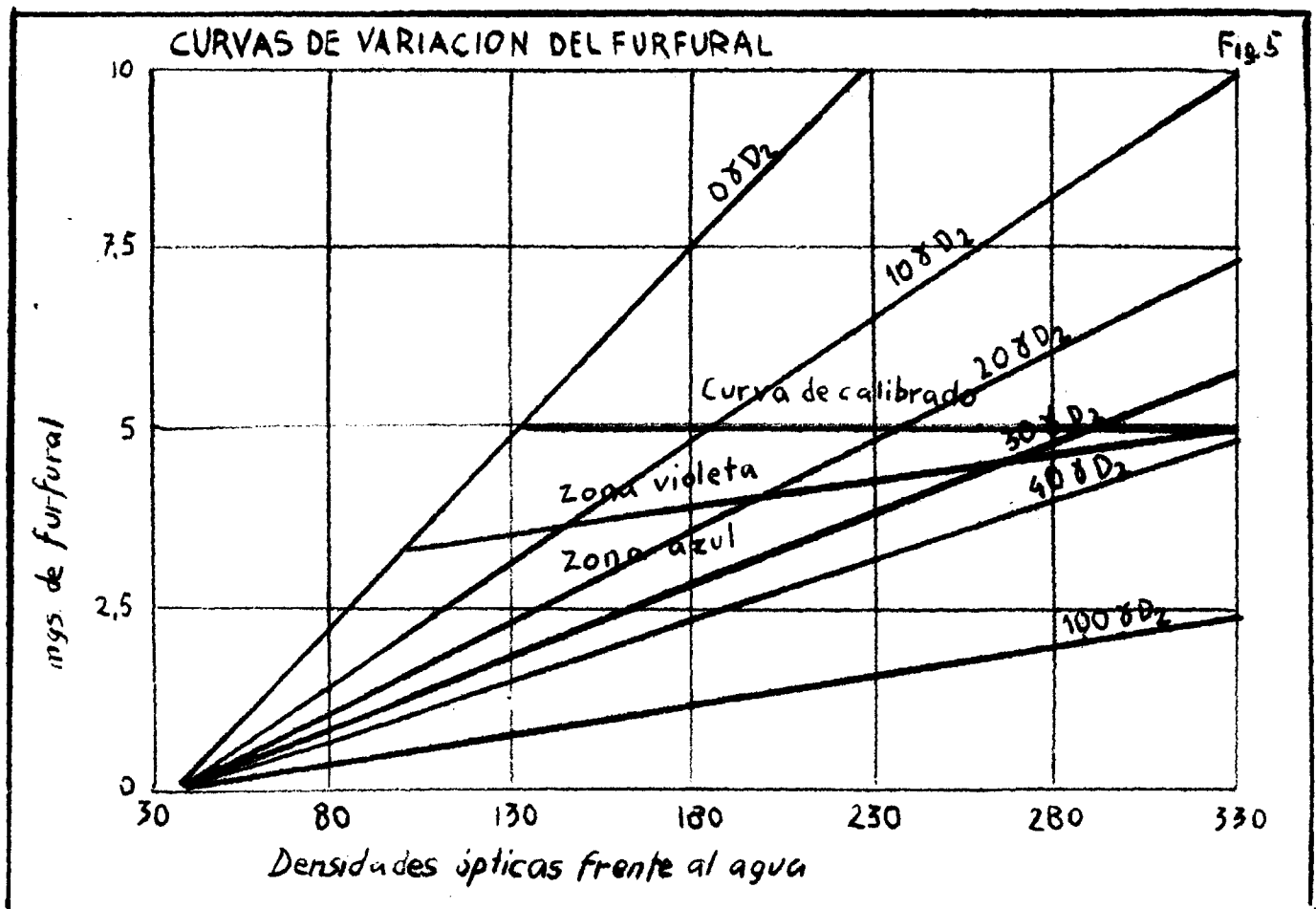
Soporte

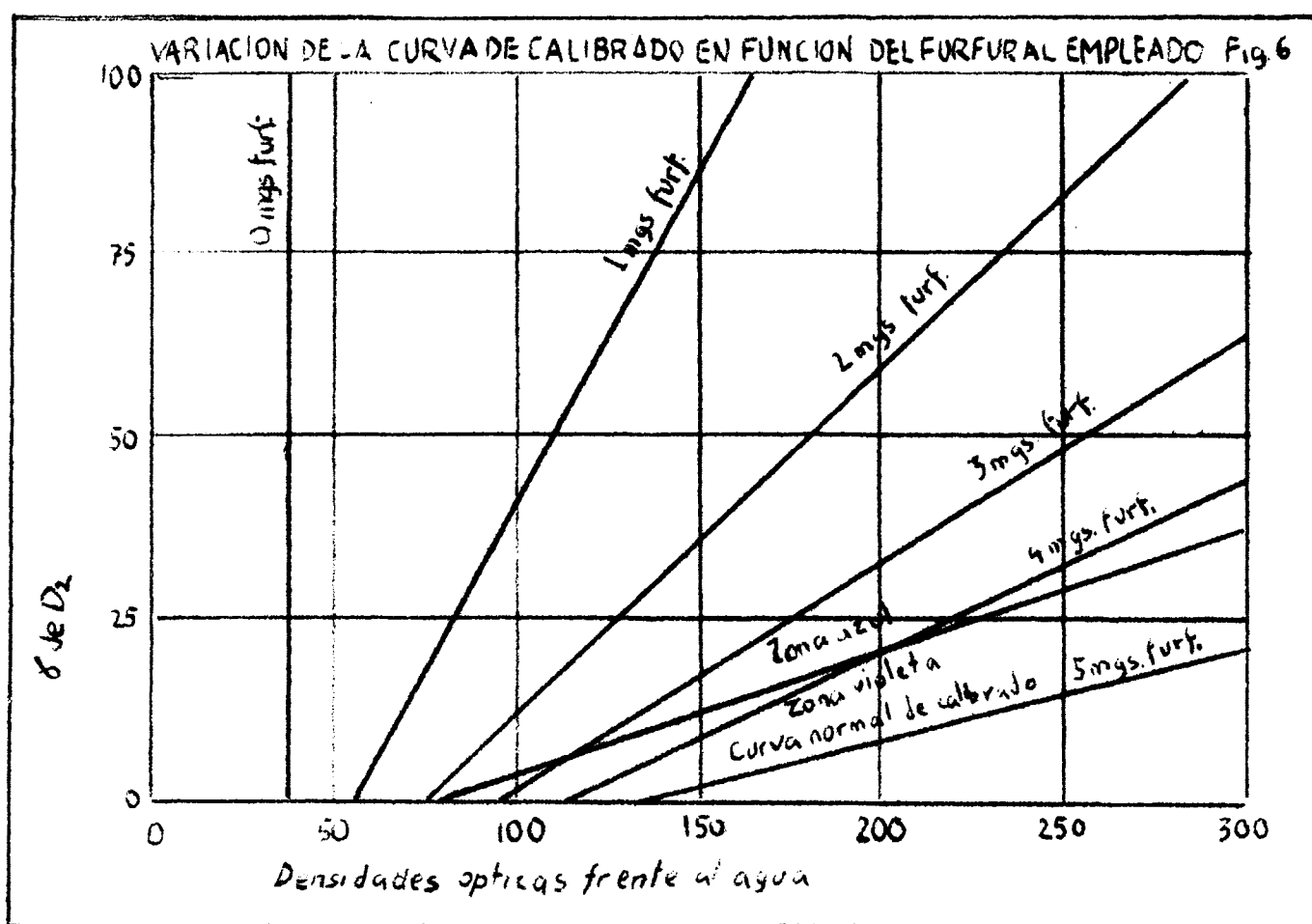
Fig. 3

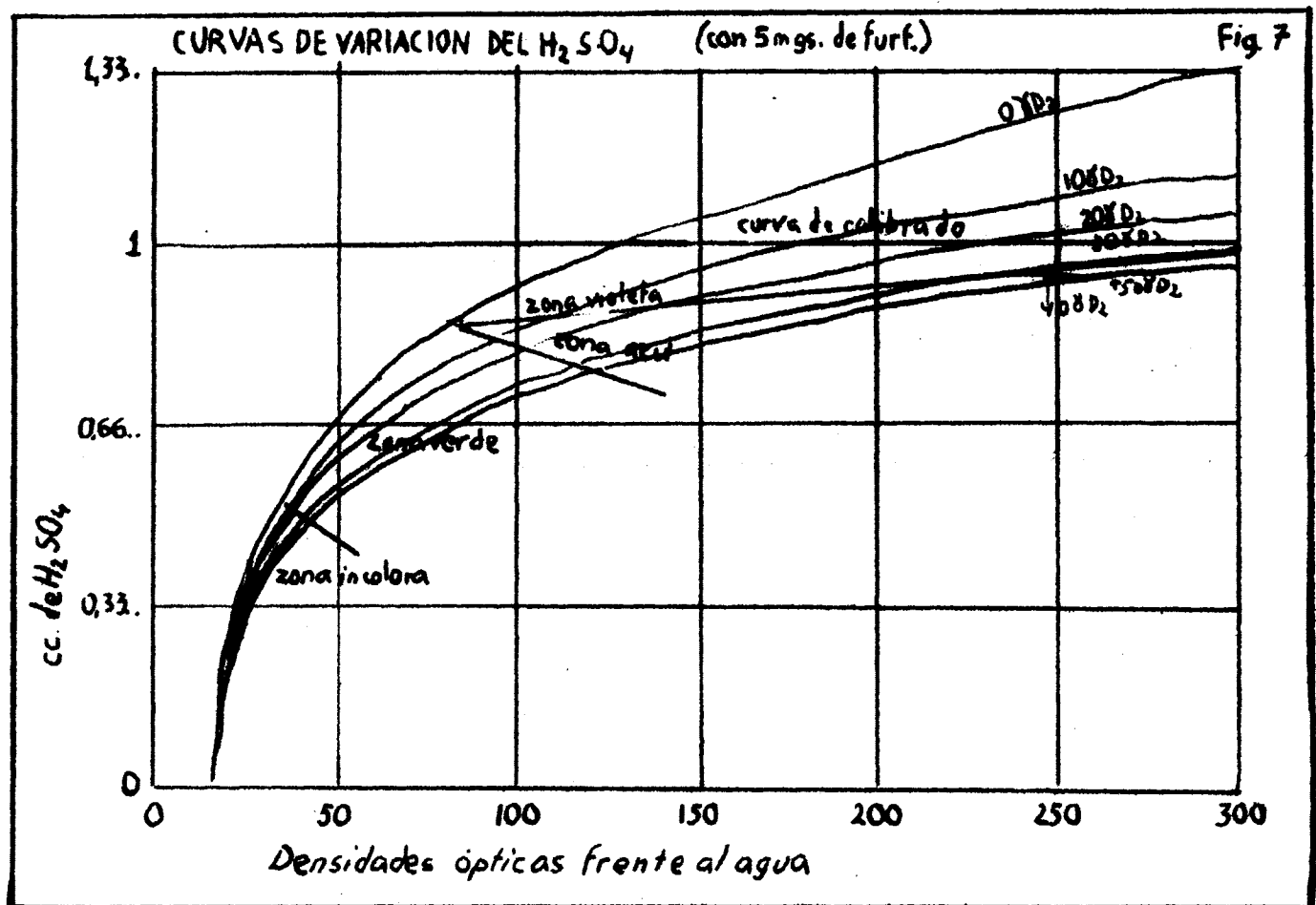
*Telofotometro*

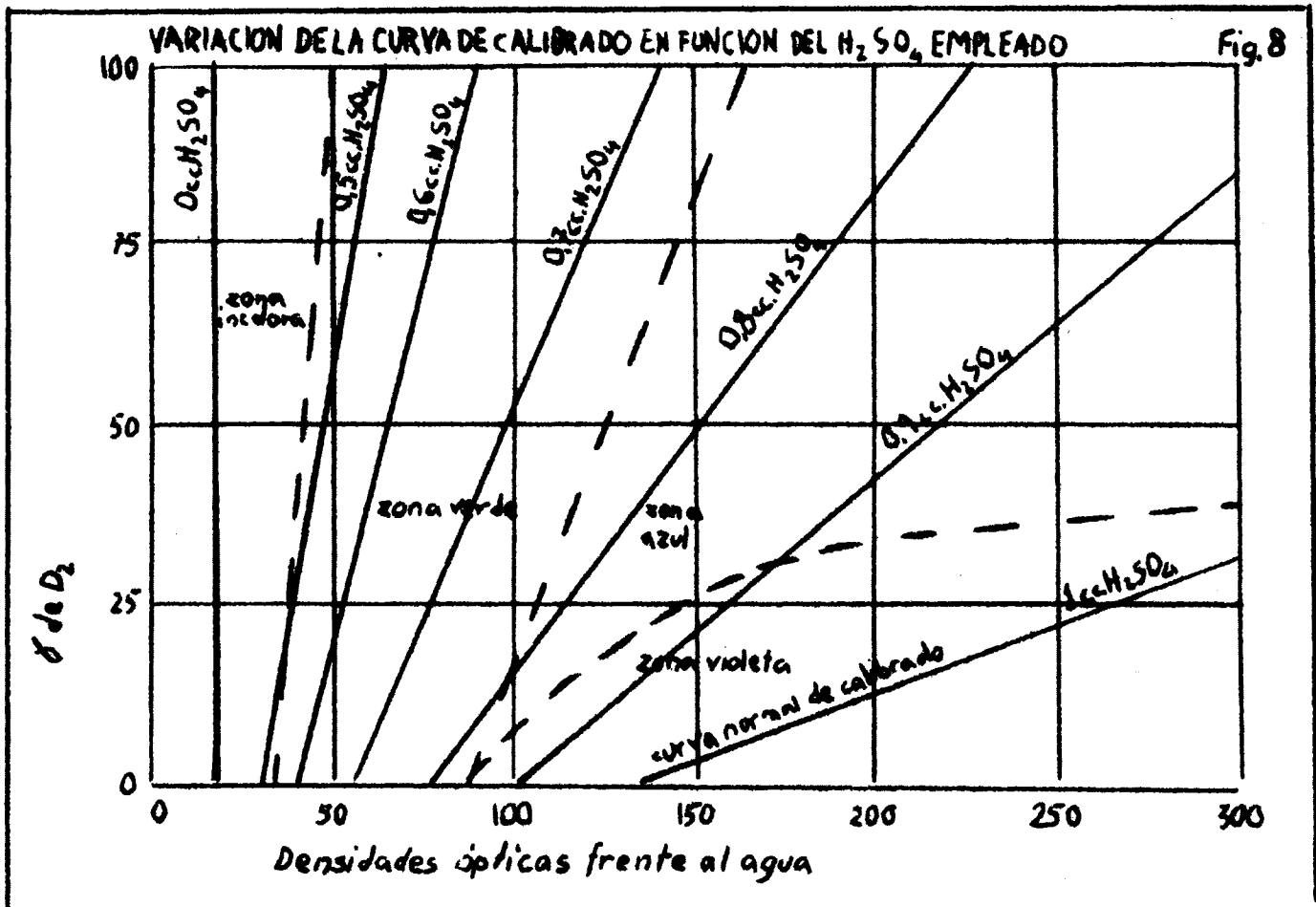


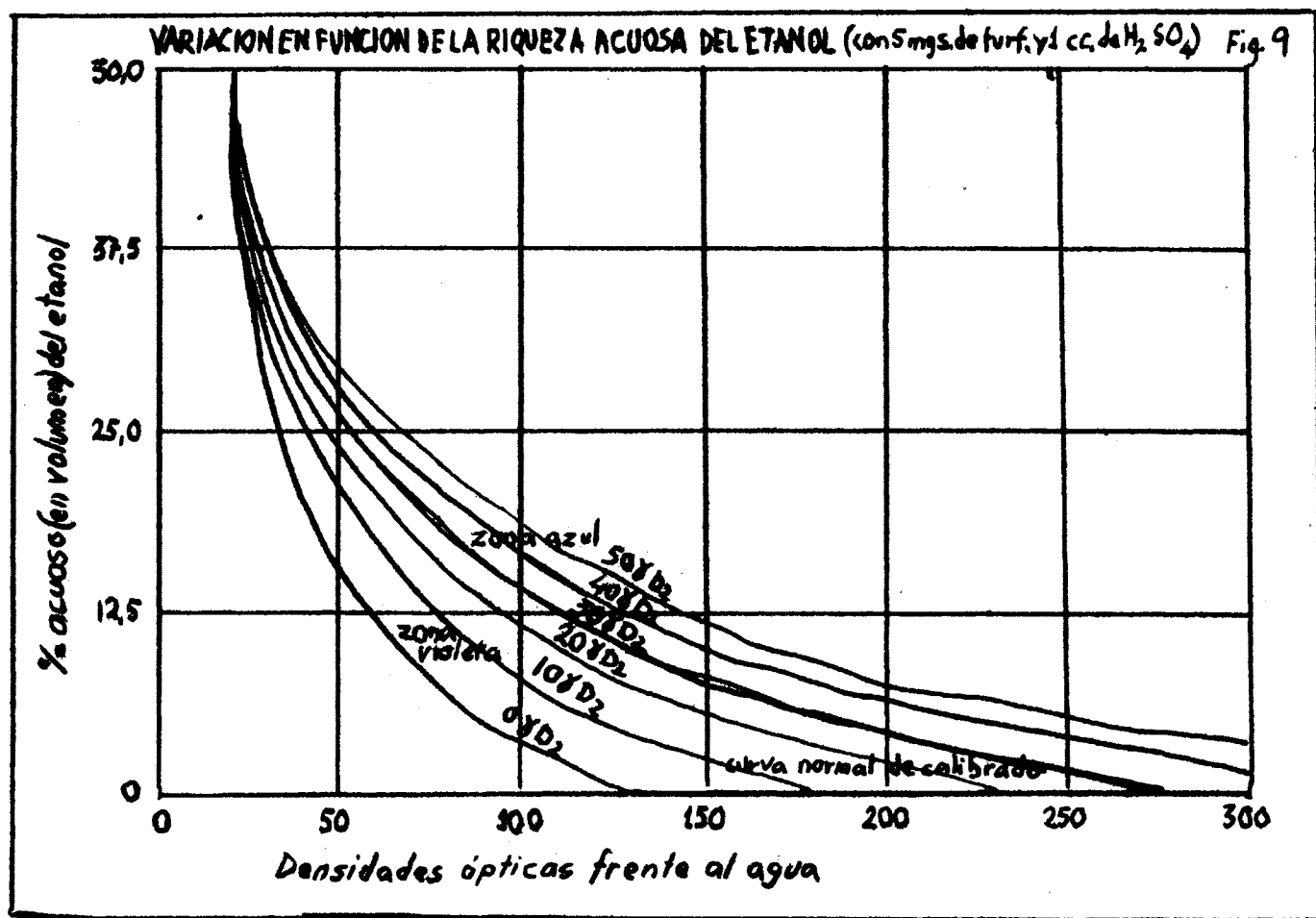




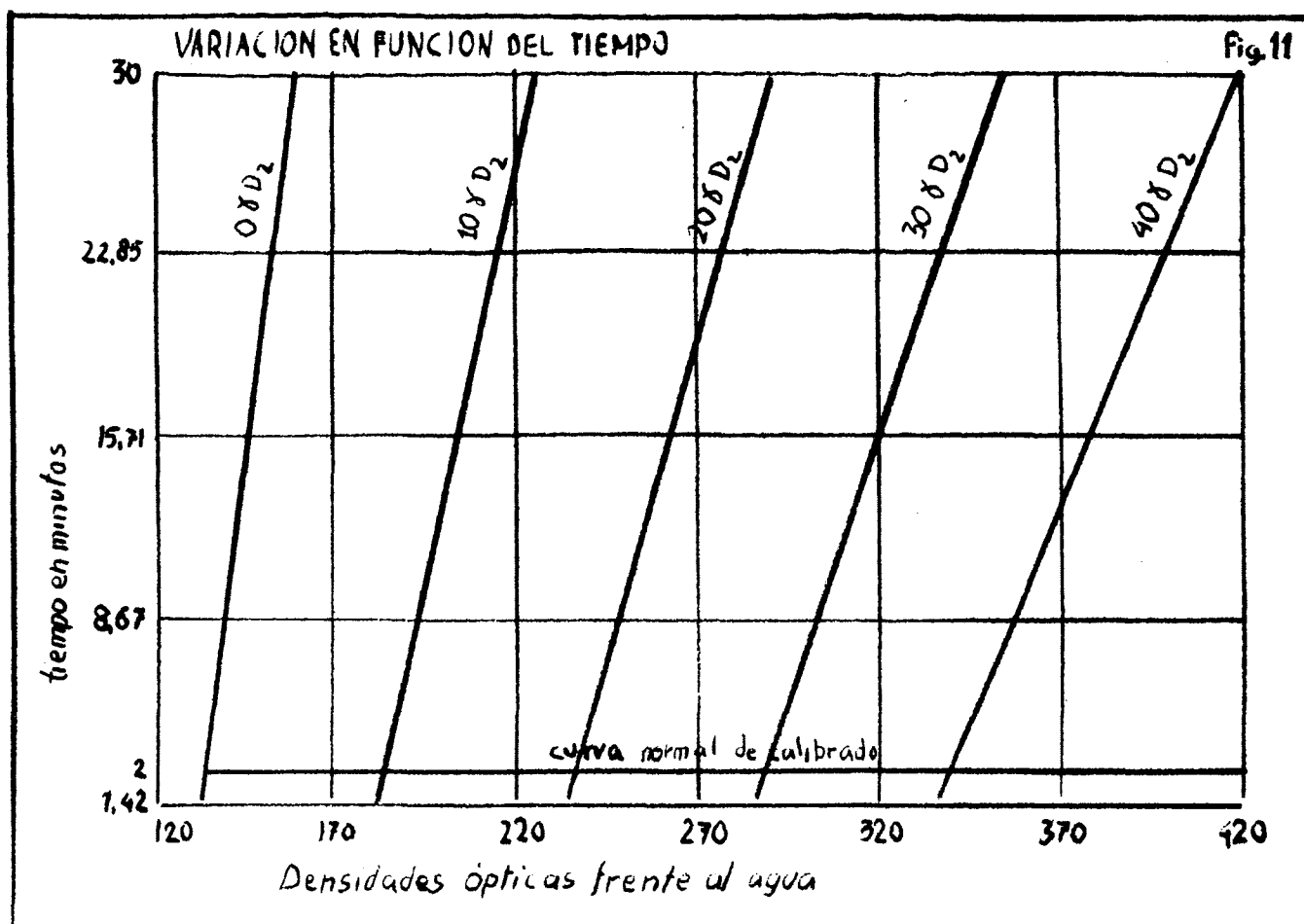




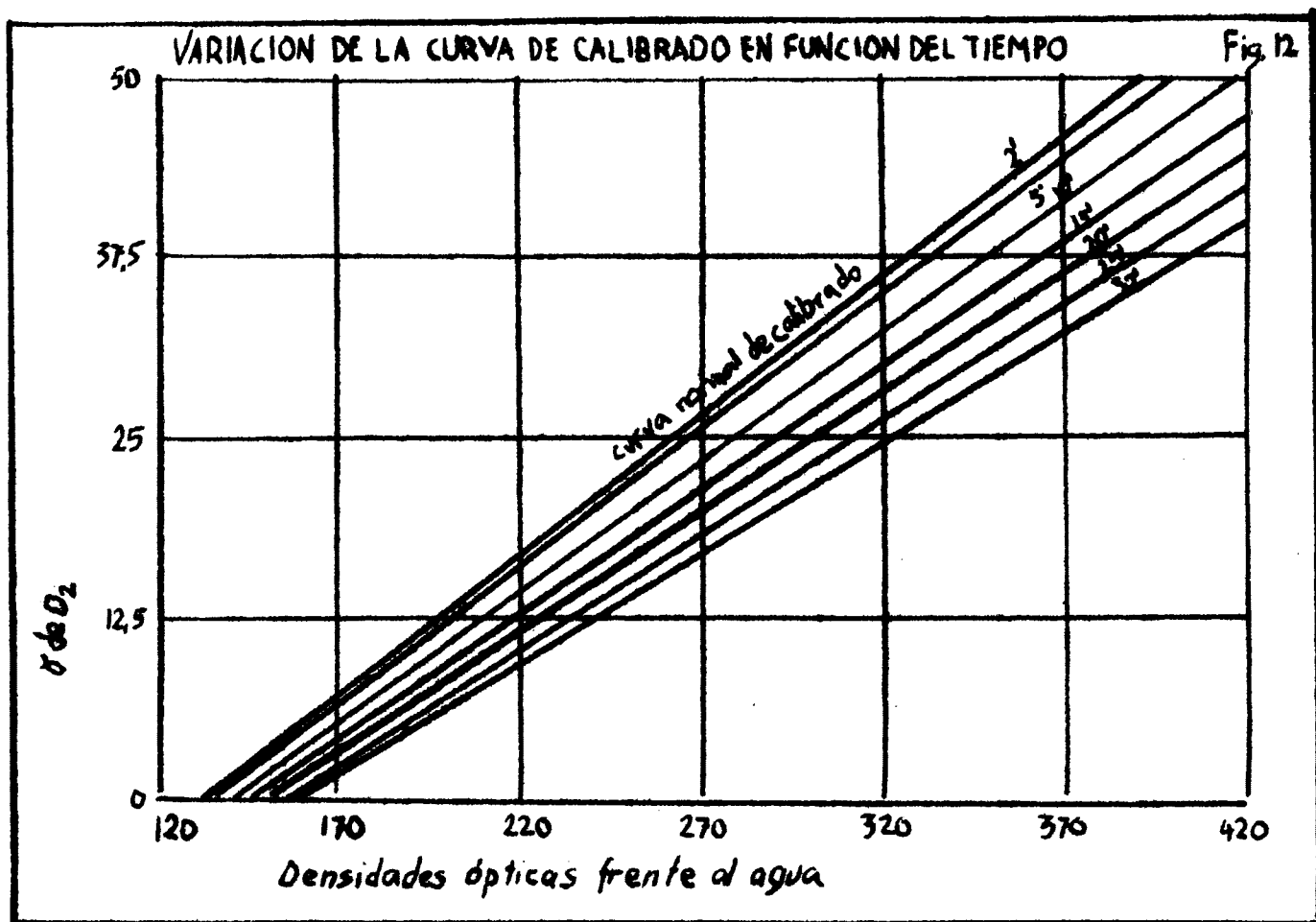




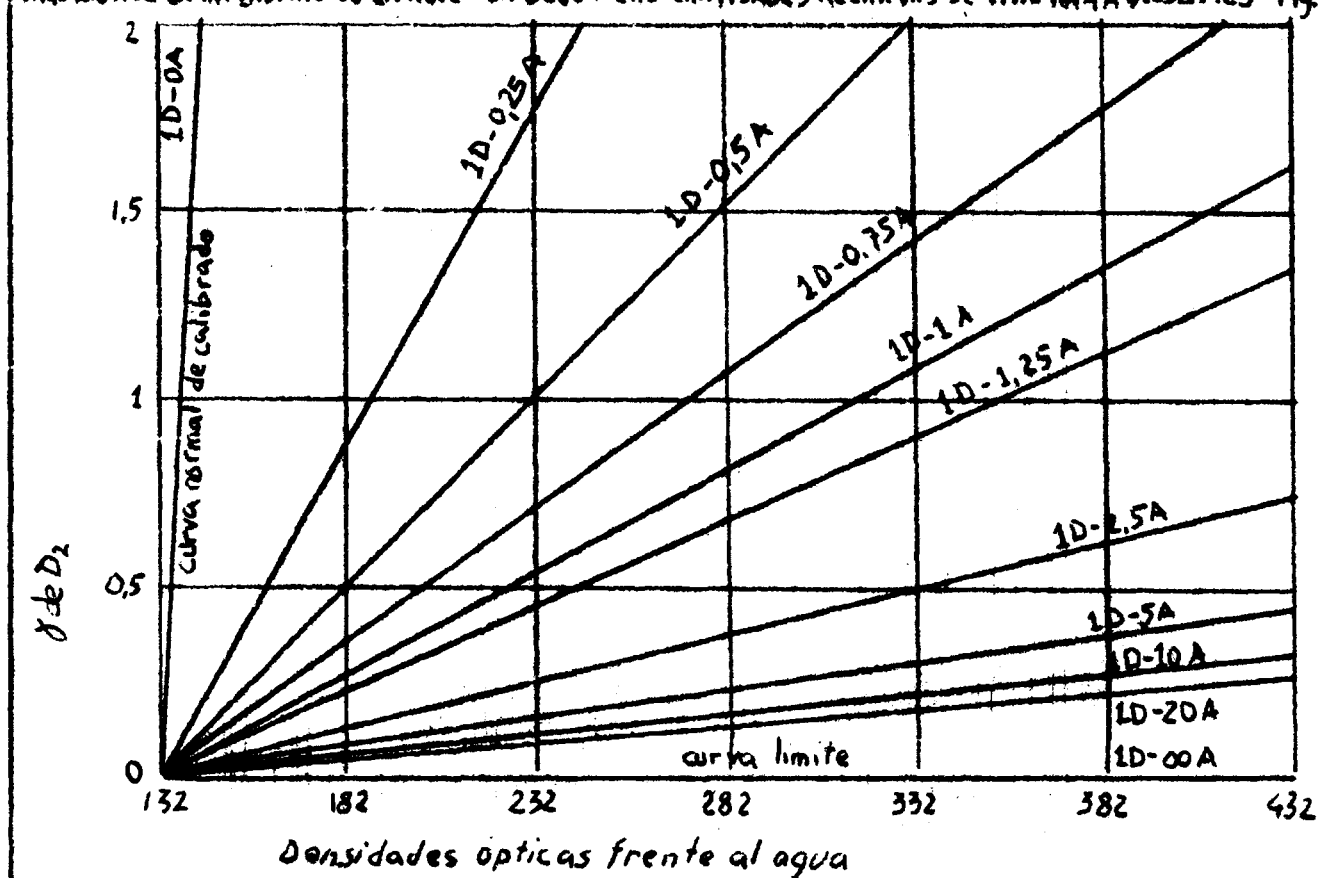


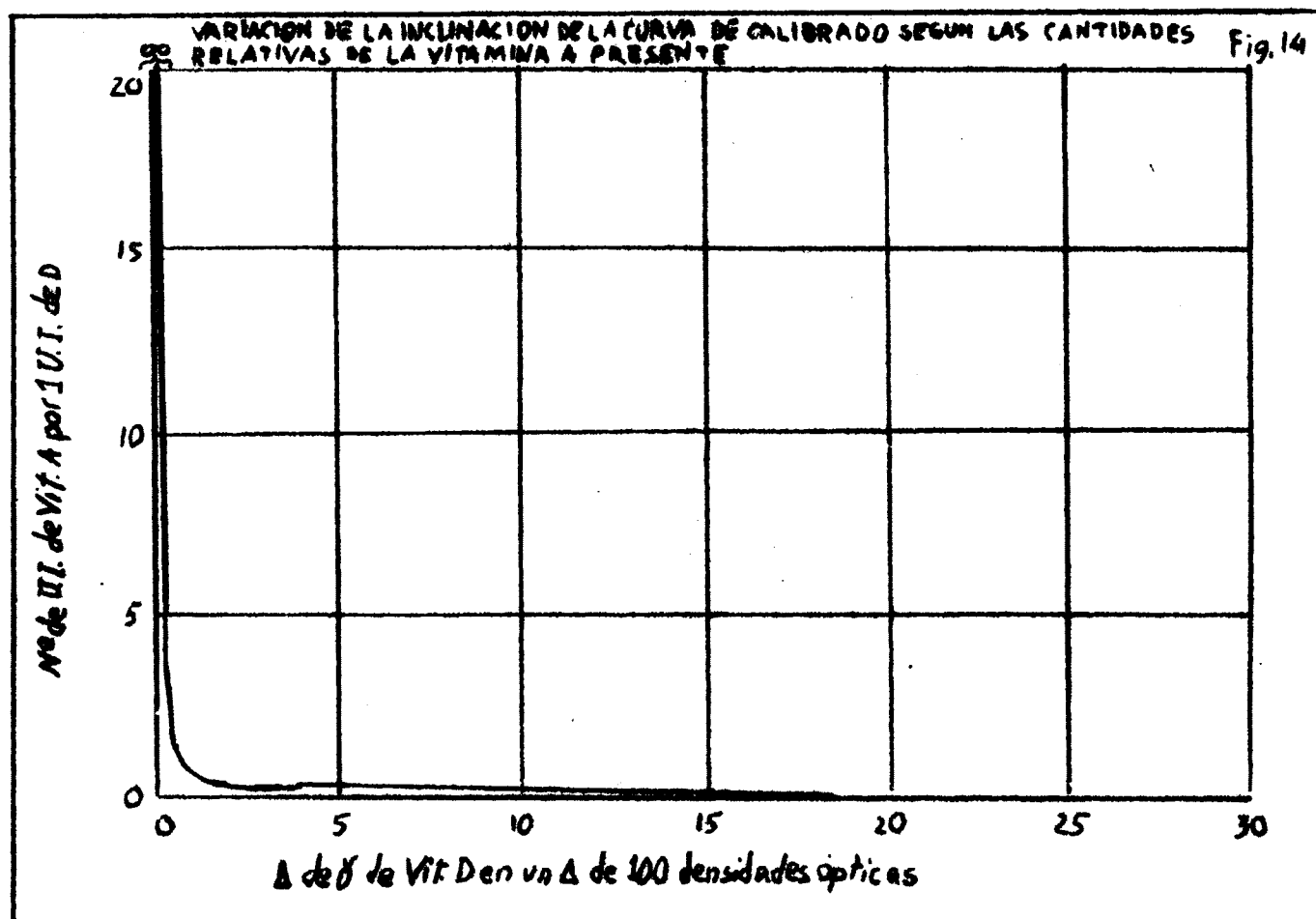


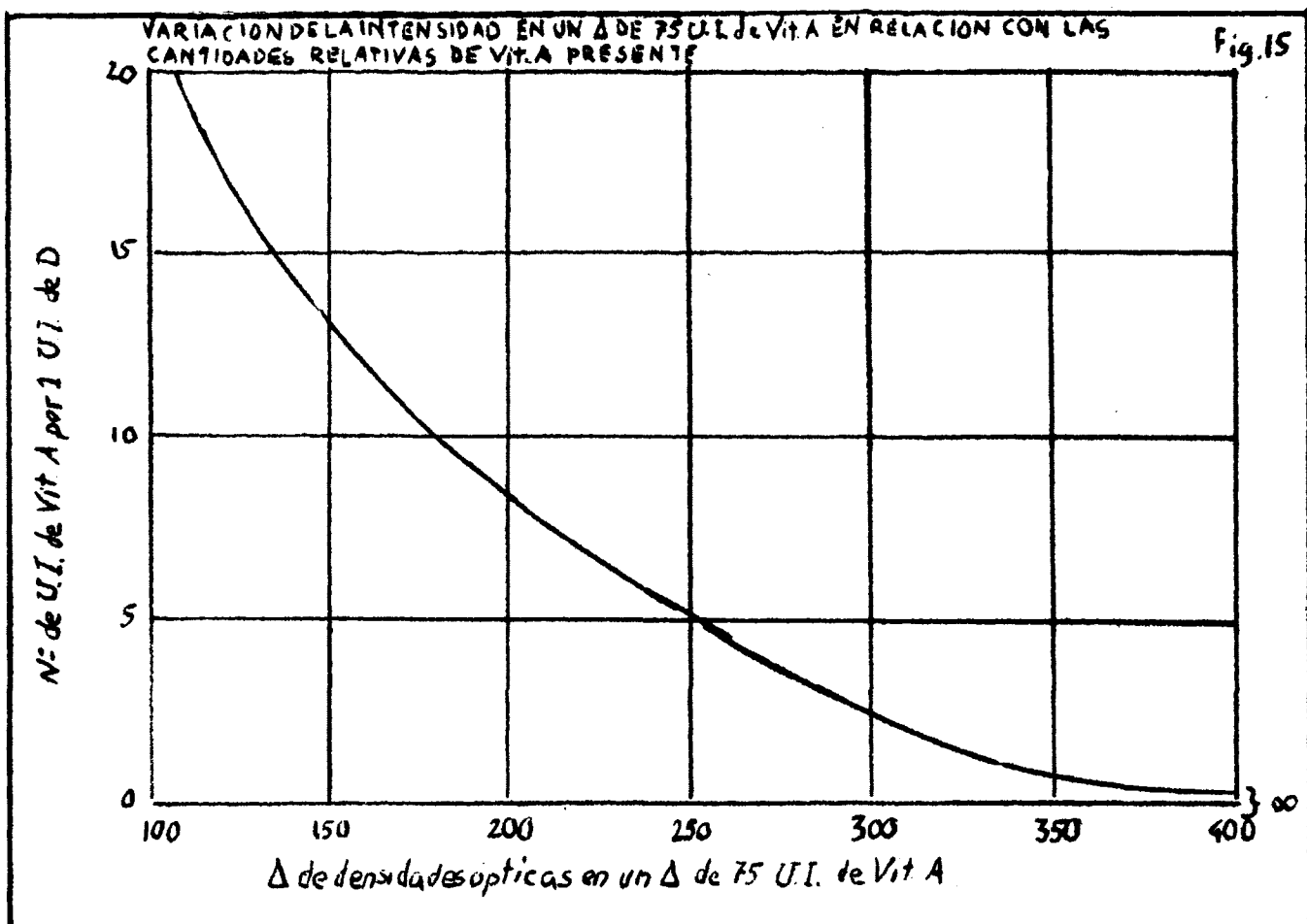


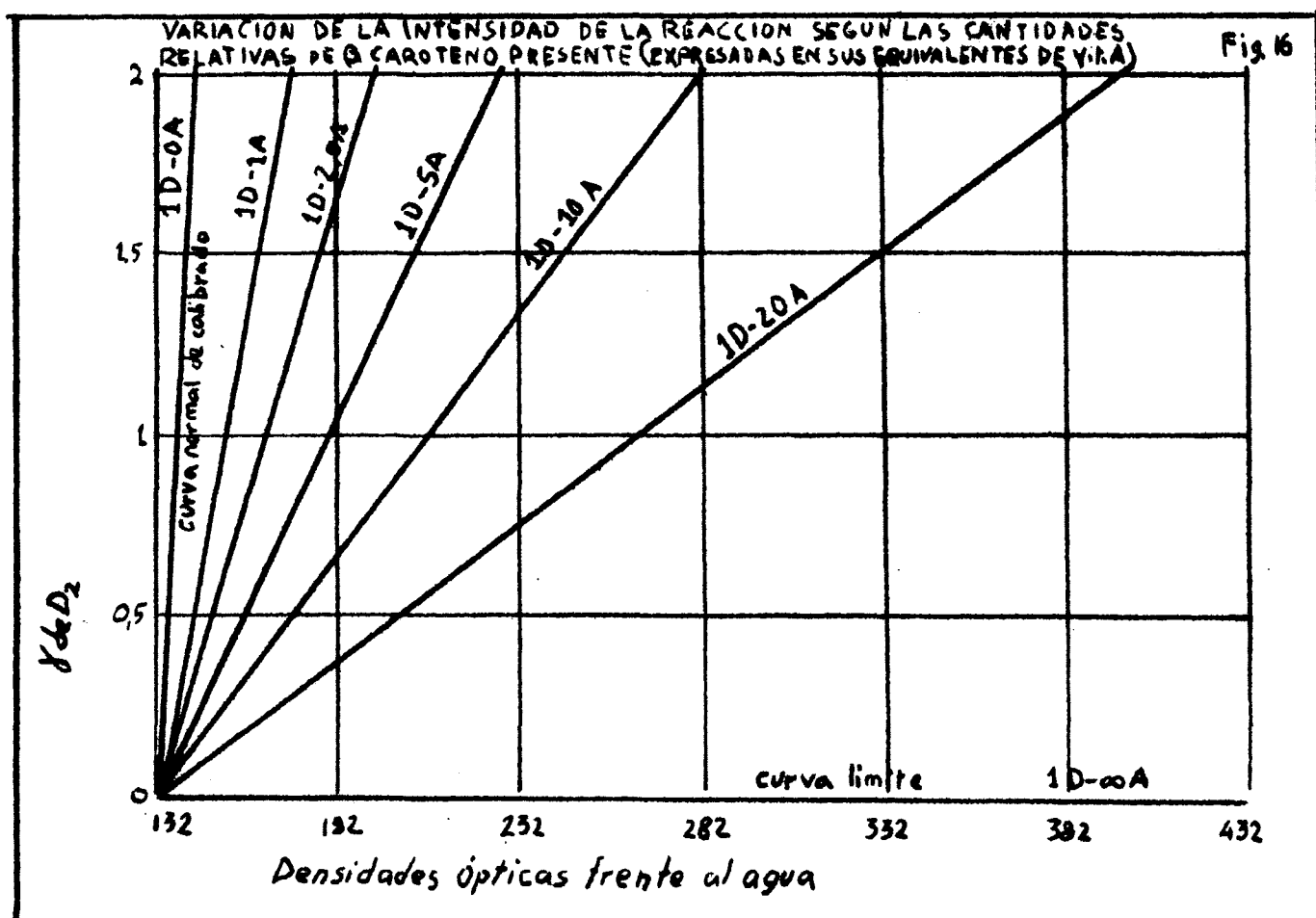


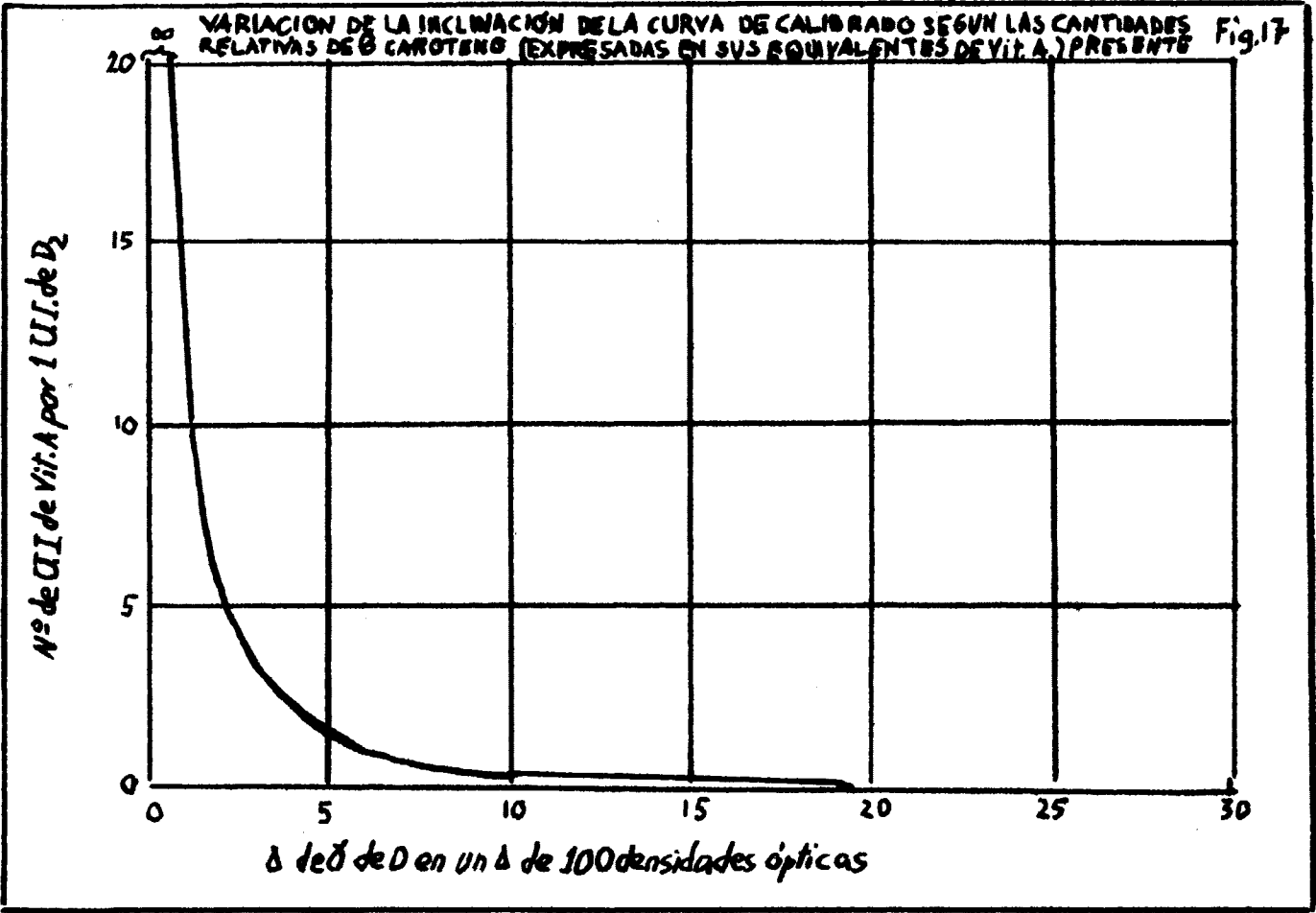
VARIACION DE LA INTENSIDAD DE LA REACCION SEGUN LAS CANTIDADES RELATIVAS DE VITAMINA A PRESENTES Fig. 13

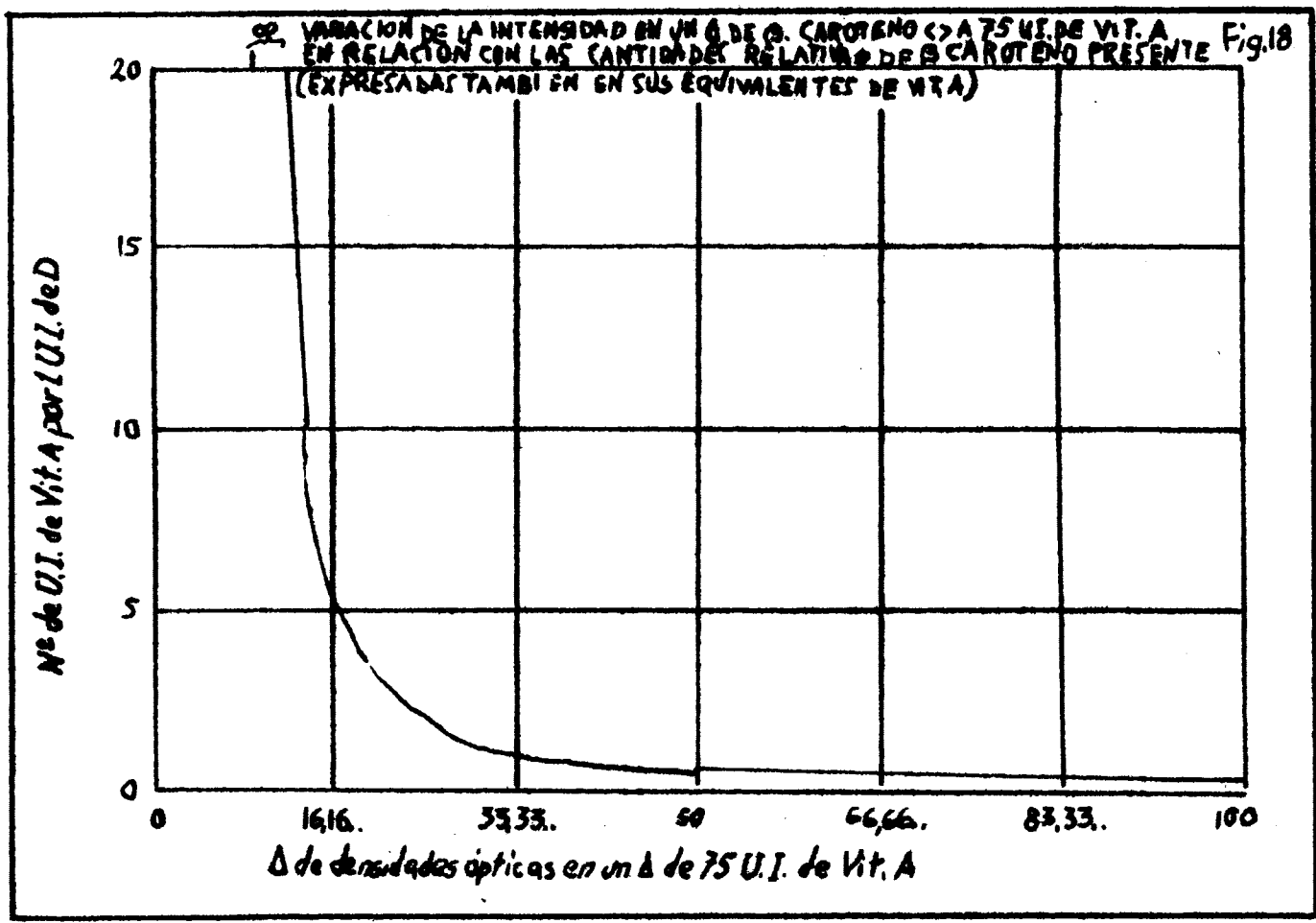


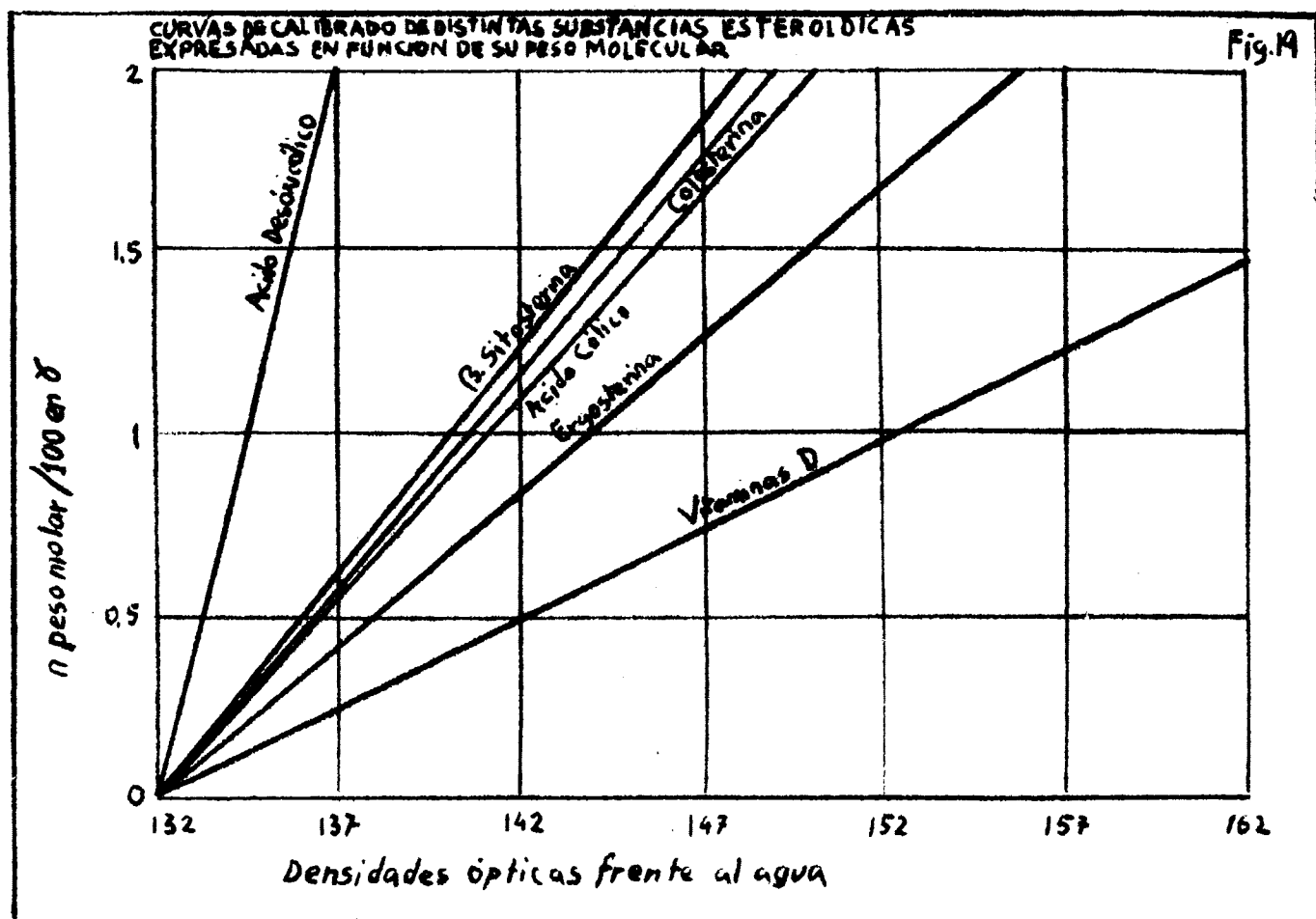














## B I B L I O G R A F I A

- A. 1 Abe y Kawaguti. J. Biochem. (Japan). 25, 181 (1937)  
2 — y — . idem. 26, 323 (1937)  
3 Askerow R. y col. Proceed. Roy. Soc. London. 109, 388 (1932)  
4 Askev F.A., Angus, Bourdillon R.B. y Webster. idem. 107, 77 (1930)  
5 — , Bruce H.M. y col. Nature. 128, 758 (1931)
- B. 1 Bills G.E., Honeywell R.M. y Cox W.M.. J. Biol. Chem. 80, 357 (1928)  
2 — , Massengale O. N., Hickman K.G.D. y Gray R.L.. idem. 126, 241 (1938)  
3 Bills M. y Brickwedde F. G.. Journ. Am. Med. As.. 110, 2150, (1938)  
4 Biltz. Ber. 40, 2184 (1907)  
5 Boer A. G., Reerink E. H., v. Wijk A. y v. Nickerk J.. Proc.

- Acad. Sci. Amsterdam. 39, 622 (1936)
- 6 Brockmann H.. Z. Physiol. Chem.. 241, 104 (1936)
- 7 — y Chen Y. H.. idem. 241, 129 (1936)
- 8 — . idem.. 245, 98 (1937)
- 9 — y Busse A.. idem.. 249, 176 (1937)
- 10 Buell G. K. y Batright. Ind. Eng. Chem.. 39, 695 (1947)
- 11 Burchard. Chem. Zentr.. 61, 25 (1890)
- 12 Busse P.. Z. Physiol. Chem.. 214, 211 (1933)
- G. 1 Cohen R. L., Salter W. T.. Journ. Biol. Chem.. 152, 484 (1944)
- 2 Carr F.H. y Jewell. W.J.. Nature. 131, 92 (1933)
- 3 Chick H., Morechensky V. y Roscoe M. H.. Biochem. J.. 20, 622 (1926)
- 4 Christensen E.. Münch. Med. Wochschr. 75, 1584 (1928)
- 5 Collum E.V. Mc., Simmonds M., Shipley F.G. y Park E. A.. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.. 18, 275 (1921)
- 6 —, —, — y —. J. Biol. Chem.. 50, 5 (1922)

- 7 — y — , — y — . *Idem.* 51, 41 (1922)
- 8 Coward K. H., Key K. M. y Morgan W. R. *Biochem. J.* 26, 1585 (1932).
- 9 Cruz-Wake. *G. R. Soc. Biol.* 105, 238 (1930)
- D. 1 Palmer O., Werder F. y Moll T.. *Z. Physiol. Chem.* 224, 86 (1934)
- 2 Dane K.. *Tab. Biol. Period.* III, 58 (1933)
- 3 Dimuth. K.. *Ber.* 68, 539 (1935)
- 4 — y Larsson H.. *idem.* 74, 520 (1941)
- 5 Dirscherl W. y Sillinen F.. *Naturwiss.* 31, 349 (1933)
- 6 Drummond J. G., Channon M. y Coward K.. *Bioch. J.* 19, 1047 (1925)
- 7 Dultz G.. *Wsch. Apotheke Ztg.* 193 (1937)
- E. 1 Eck J. C. y Thomas S.H.. *J. Biochem.* 128, 257 (1939)
- 2 Ammerie A. y v. Ekelan M.. *Acta. brev. Med. Physiol.* 6, 133 (1936)

- 3 Mader F.. Z. Vitaminforsch.. 2, 241 (1933)
- 4 —. Idem.. 3, 161 (1934)
- F. 2 Fuchs L.. Pharm. Press. Wiss. Prakt.. 81, 93 (1933)
- G. 1 Guilbert M. R.. Ind. Eng. Chem. Anal.. 22, 664 (1930)
- H. 1 Halden W.. Naturwiss. 24, 296 (1936)
- 2 — y Tizoni H.. Nature.. 137, 909 (1936)
- 3 Hammarsten L.. Z. Phys. Chem.. 61, 495 (1909)
- 4 Haslewood G. A. D. y Drummond J. C.. J. Soc. Chem. Ind.. 53, 598 (1936)
- 5 Häussler E. P. y Brauchli E.. Helv. Chim. Acta. 12, 187 (1929)
- 6 Heiduschka A. y Lindner M.. Z. Physiol.. 181, 15 (1929)
- 7 Heilbron J. M., Kann E. D. y Morton R.A.. J. Soc. Chem. Ind.. 45, 932 (1926)
- 8 —, —y —. Biochem. J.. 21, 78 (1927)
- 9 — y Spring F.S.. Biochem. J.. 24, 133 (1930)
- 10 —, Haslop R.N. y col.. Idem.. 26, 1178 (1932)

- 11 Hess A. F. y Gutman R. G.. J. Am. Med. Assoc.. 78, 29 (1922)
  - 22 — y Steenbock H.. J. Biol. Chem.. 50, 77 (1922)
  - 13 —. Am. J. Diseases Children. 28, 517 (1924)
  - 14 — y Hainstock M.. J. Biol. Chem.. 68, 59 (1924)
  - 15 — , — y Helman F. D.. Idem.. 63, 305 (1926)
  - 16 Hickmann A.. Ind. Eng. Chem.. 29, 1107 (1937)
  - 17 Hopkins F. G.. Analyst.. 31, 395 (1906)
  - 18 — . J. Physiol.. 44, 425 (1912)
  - 19 Haldschinsky K. Deut. Med. Wochschr.. 45, 712 (1919)
  - 20 — . Z. Orthop. Chir.. 29, 226 (1919)
  - 21 Hume K. M.. Lancet.. II, 1318 (1922)
  - 22 — y Chick H.. Med. Research. Council. Rept. IV The standardization and estimation of vit A. (1935)
- I. 1 Inhoffen H.. Anal.. 508, 81 (1934)
  - J. 1 Jenke N.. Klin. Wochschr.. 18, 317 (1939)
  - K. 1 Kägi H. y Miescher. Helv. Chim. Acta. 22, 683 (1936)

- 2 Kailan. Monatsh. Chem.. 28, 927 (1907)
- 3 Karrer P., Morf R. y Schöpp K.. Helv. Chim. Acta. 14, 1036 (1931)
- 4 — , — y — . Idem.. 14, 1431 (1931)
- 5 — y — . Idem.. 16, 625 (1933)
- 6 Kaziro K. y Shimura T.. Z. Phys. Chem.. 254, 57 (1938)
- 7 — y — . Idem.. 249, 220 (1937)
- 8 Kerr G.W. y Hochm W. M.. Arch. Biochem.. 4, 155 (1944)
- L. 1 Lettré M.. Annal.. 511, 280 (1934)
- 2 Lieberman. Ber. 18, 1803 (1885)
- 3 Linser U.. Z. Physiol. Chem.. 241, 125 (1936)
- M. 1 Marcussen K.. Dansk. Tids. Farm.. 13, 141 (1939)
- 2 Massengale O. N. y Nussmeier M.. J. Biol. Chem.. 87, 423 (1932)
- 3 Meessenmaecker R.. J. Pharm. Chim.. 11, 380 (1930)
- 4 Mellamby K.. J. Physiol.. 52, 53 (1919)
- 5 — . Lancet. I, 407 (1919)

- 6 Meunier P.. Compt. Rend. 217, 78 (1943)
- 7 Milas, Heggie y Reynolds. Ind. Eng. Chem.. 13, 227 (1941)
- 8 Mohler. Helv. Chim. Acta. 20, 811 (1937)
- 9 Mozolowski W.. Nature, 142, 121 (1939)
- 10 Müller P. B.. Helv. Chim. Acta. 30, 1172 (1947)
- 11 Munsey V. E.. J. Assoc. of Agr. Chem.. 22, 664 (1939)
- 12 Muschel F. E. y Ackerson C. W.. Poultry. Sci.. 9, 334 (1939)
- N. 1 Nath M. G. y Chakraborty M. K.. Am. Microb. Exp. Med. 2, 73 (1942)
- 2 -- . Idem.. 253 2, 83 (1942)
- 3 Mercher O. y Reichstein T.. Helv. Chim. Acta. 19, 1382 (1936)
- 4 Nield C. M., Russell W.G. y Zimmerli A.. J. Biol. Chem.. 136, 73 (1940)
- 5 Noller G.R. y col.. J. Am. Chem. Soc.. 64, 3047 (1942)
- O. 1 Ohyama P.. J. Biochem. (Japan) 27, 351 (1938)
- P. 1 Partridge S. M.. Nature, 158, 270 (1946)

- 2 Penau H. y Hagsman. Helv. Chim. Acta. 29, 1366 (1946)
- 3 Petrow V. A., Rosenheim O. y Starling W.W.. J. Chem. Soc.. 677 (1938)
- 4 Pettenkofer. Annal. Chem. Pharm. . 52, 90 (1888)
- 5 Pirlot O. y Rouir S.V.. Bull. Soc. Chim. Belg.. XII (1947)
- 6 Pohl R.. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen III, 185 (1926)
- 7 Poullson E. y Lovenskiold M.. Biochem. J.. 22, 1351 (1928)
- 8 Pregl H.. Z. Physiol. Chem.. 45, 166 (1905)
- R. 1 Raczynski J.. Compt. Rend. Assoc. Intern. Pediat. 308 (1913)
- 2 Reerink E. H. y v. Wijk A.. Biochem. J.. 23, 1294 (1929)
- 3 — y — . Idem.. 25, 1001 (1931)
- 4 — y — . Chem. weekblad. 645 (1932)
- 5 Ritsert K. y E. Mercks. Jahvesbericht. 19, (1935)
- 6 — y — . Idem. 57, 27 (1938)
- 7 Rosenberg H.. Chemistry and Physiol. of the Vit. New York. 17 (1945)



- 8 Rosenheim O. y Webster T. A.. Lancet. I, 1925 (1925)
  - 9 — y — . J. Soc. Chem. Ind., 45, 932 (1926)
  - 10 — y — . Biochem. J., 20, 537 (1926)
  - 11 — y — . Idem., 21, 127 (1927)
  - 12 — y — . Lancet. I, 306 (1927)
  - 13 — y — . Biochem. J., 21, 389 (1927)
  - 14 — y — . Lancet. II, 522 (1927)
  - 15 — . Biochem. J., 23, 47 (1929)
  - 16 Rouir E.V. y Parlot G.. Bull. Soc. Chim. Biol., 29, 1005 (1947)
- B. 1 Salkowski. Z. Phys. Chem., 57, 525 (1908)
- 2 Santos Ruiz A., Vitaminas. Madrid. 69 (1941)
  - 3 — y Villar Palasí V.. An. Fis. Quim., 40, 1194 (1944)
  - 4 — y — . Idem., 42, 539 (1946)
  - 5 — y Correia A. J.. Rev. Esp. Fisiol., III, 49 (1947)
  - 6 Schalteger H.. Helv. Chim. Acta. 29, 285 (1946)
  - 7 Schenck F.. Naturwiss. 25, 159 (1937)

- 8 Scherrer. *Helv. Chim. Acta.* 22, 1329 (1939)
- 9 Schmidt L. M. y Hughes H. B.. *J. Biol. Chem.* 143, 771 (1942)
- 10 Schultz F. W. y Morse M.. *Am. J. Diseases Children.* 30, 199  
(1925)
- 11 Sephcott H. y Bacharach A. L.. *Biochem. J.* 22, 135 (1928)
- 12 Shear M. I.. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 23, 546 (1925)
- 13 Sheets O. y Funk C.. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 20, 89  
(1922)
- 24 Sherman H. C. y Stiebeling H.K. *J. Biol. Chem.* 83, 497 (1929)
- 15 Simons E.J. H. y Zucker T.E.. *J. Am. Chem. Soc.* 58, 2655  
(1936)
- 16 Smakula A.. *Nachr. Ges. wiss. Göttingen* III, 49 (1928)
- 17 Sobel, Mayer y Kramer. *Ind. Eng. Chem.* 17, 160 (1945)
- 18 Sternbock H.. *Science.* 60, 224 (1924)
- 19 — y Nelson M. T.. *J. Biol. Chem.* 62, 209 (1924)
- 20 — y Black A.. *Idem.* 61, 405 (1924)

- 21 — y — . Idem.. 64, 265 (1925)
- 22 Stepp W., Kühnau J. y Schoeder H.. Die Vit. und ihre Klin.  
Anw.Stugart. 327 (1944)
- 23 Stoeltzner W.. Münch. Med. Wochschr.. 75, 1584 (1928)
- 24 Suerrant B.N. y Chilcote E. M.. Analitical Chem.. 20, 465 (1940)
- T. 1 Tanrret.G.. Ann. Chim. Phys.. V 19, 393 (1879)
- 2 — . Idem. VI 20, 289 (1890)
- 3 — . Idem. VIII 15, 313 (1908)
- 4 — . Compt. rend.. 198, 98 (1889)
- 5 — . Idem.. 147, 75 (1908)
- 6 Topelmann H. y Schuhknecht W.. Z. Vitaminforsch. 4, 11 (1935)
- 7 Tortelli M. y Jaffé E.. Ann. Chim. applicata. 2, 80 (1914)
- 8 Trousseau A.. Clinical Medicine. Filadelfia. (1882)
- 9 Tzoni H.. Biochem. Z.. 287, 18 (1936)
- U. 1 Udransky L. v.. Z. f. Phys. Chem.. 12, 355 (1888)
- V. 1 Velazquez. Farmacología y Terapéutica de Vit. Madrid. 92, (194 )

- 2 Villar Palasi V.. Nature. 159, 88 (1947)
- 3 — . An. Fis. Quim.. 421, 500 (1947)
- 4 Vogel H.. Chemie u. Technik d. Vit.. Stuttgart. 57 (1943)
- 5 — . Idem.. 101 (1943)

- W. 1 Waddell J.. J. Biol. Chem.. 105, 711 (1934)
- 2 Webster T.A. y Bourdillon H. B.. Biochem. J.. 22, 1223 (1928)
- 3 Westphal U.. Ber.. 72, 1243 (1939)
- 4 Wislizeni H. y Seibert. Z. Physiol. Chem.. 262, 1 (1939)
- 5 Windaus, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen III, 185 (1926)
- 6 — . Idem.. III, 175 (1927)
- 7 — y Hess A.. Proceed. Soc. exp. Biol. Med.. 24, 171 (1927)
- 8 — y Deppe H.. Annal.. 489, 252 (1931)
- 9 — . Dtsch. Med. Wochr.. 58, 1669 (1932)
- 10 — , Dithmar y Fernholz. Annal.. 493, 259 (1932)
- 11 — , Linsert O., Lüttringhaus A. y Weidlich U.. Annal.. 492, 226 (1932)

- 12 — , v. Werder F. y Gschalder B.. Ber..65, 1106 (1932)
- 13 — y Langer R.. Annal.. 509, 105 (1933)
- 14 — , Lettré M. y Schenk F.. Annal.. 520, 98 (1935)
- 15 — y Thiele W.. Idem.. 521, 160 (1935)
- 16 — y Bock. F.. Z. Physiol Chem.. 245, 108 (1937)
- 17 — y Trautmann. Z. Physiol Chem.. 247, 185 (1937)
- 18 Witt J. B. de y Sullivan M. K.. Ind. Eng. Chem.. 18, 119 (1946)
- 19 Woker G. y Antener J.. Helv. Chim. Acta.. 21, 1345 (1938)
- 20 — y — . Idem.. 22, 47 (1939)
- 21 — y — . Idem.. 22, 511 (1939)
- 22 — y — . Idem.. 22, 515 (1939)
- 23 — y — . Idem.. 22, 666 (1939)
- 24 — y — . Idem.. 22, 1309 (1939)
- 25 — y — . Idem.. 22, 1345 (1939)
- 26 Wolf L. K.. Z. Vitaminforsch. 7, 277 (1938)
- 27 Wunderlich. H.. Z. Physiol. Chem.. 241, 116 (1936)

- Y. 1 Yoder L.. J. of Biol. Chem.. 116, 71 (1936)
- Z. 1 Zucker T. F., Pappenheimer A. M. y Barnett M., J. Biol. Chem..  
19, 167 (1922)